

**ZUSAMMENWIRKEN DES PROKARZINOGENS
BENZO[A]PYREN
MIT PFLANZLICHEN FLAVONOIDEN
AUF KARZINOGENESE-RELEVANTE PROZESSE
IN DER HUMANEN
KOLON-ADENOKARZINOMA-ZELLINIE CACO-2**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Manuela van Liempt

aus Bottrop
Februar 2014

Angaben zur Prüfung

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU-Dortmund (IfaDo) durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Shirley Knauer

2. Gutachter: PD. Dr. Peter Roos

3. Gutachter: PD. Dr. Jürgen Thomale

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hynek Burda

Tag der mündlichen Prüfung: 08.04.2014

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	- 5 -
2	EINLEITUNG.....	- 7 -
2.1	KARZINOGENESE DES DICKDARMS	- 7 -
2.2	CHEMISCH INDUZIERTE KARZINOGENESE: BENZO[A]PYREN	- 7 -
2.3	DER ARYLHYDROKARBON-REZEPTOR ALS VERMITTLER VON BAP-EFFEKTEN.....	- 10 -
2.4	WEITERE LIGANDEN DES AHR: FLAVONOIDE.....	- 13 -
2.5	BENZO[A]PYREN UND DIE DNA-SCHADENSKONTROLLE - γ H2AX	- 15 -
2.6	DER ARYLHYDROKARBON-REZEPTOR UND APOPTOSE	- 17 -
2.7	DER ARYLHYDROKARBON-REZEPTOR UND ZELLZYKLUS	- 17 -
2.8	ZUSAMMENSPIEL DES ARYLHYDROKARBON-REZEPTORS MIT ANDEREN SIGNALWEGEN	- 19 -
2.8.1	Die MAPK-Signalwege	- 19 -
2.8.2	Der AKT (PKB)-Signalweg	- 20 -
2.8.3	Der Nrf2-Signalweg	- 21 -
3	ZIEL DER ARBEIT	- 23 -
4	MATERIAL	- 25 -
4.1	CHEMIKALIEN	- 25 -
4.2	ZELLKULTUR-LÖSUNGEN	- 26 -
4.3	ANTIKÖRPER UND SONDEN	- 26 -
4.3.1	Antikörper	- 26 -
4.3.2	Sonden für Real-time-PCR	- 27 -
4.4	GERÄTE	- 27 -
4.5	SOFTWARE.....	- 28 -
4.6	VERBRAUCHSMATERIALIEN	- 28 -
5	METHODENTEIL	- 29 -
5.1	ZELLKULTUR.....	- 29 -
5.1.1	Auftauen Caco-2-Zellen	- 29 -
5.1.2	Passagieren Caco-2-Zellen.....	- 29 -
5.2	ZYTOTOXIZITÄTSTEST	- 30 -
5.3	PROTEINAUFREINIGUNG	- 31 -
5.4	BC-ASSAY.....	- 31 -
5.5	SDS-PAGE (POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE)	- 32 -
5.5.1	Vorbereitung der SDS-Gele + Probenaufbereitung.....	- 33 -
5.5.2	Molekulargewicht-Marker.....	- 34 -
5.5.3	Standards.....	- 34 -
5.5.4	Gelelektrophorese	- 34 -
5.6	WESTERN-BLOT-ANALYSE	- 35 -
5.7	RNA-AUFREINIGUNG MIT TRIZOL	- 36 -
5.8	BESTIMMUNG DER RNA-KONZENTRATION	- 37 -
5.9	AGAROSEGELELEKTROPHORESE.....	- 37 -
5.10	REVERSE-TRANSKRIPTION	- 38 -
5.11	REAL-TIME-PCR	- 38 -
5.12	COMET-ASSAY.....	- 39 -
5.13	HERSTELLUNG VON DEPC-WASSER.....	- 41 -
5.14	FACS (FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING)	- 41 -
5.15	BESTIMMUNG DER ETHOXYRESORUFIN-O-DEETHYLASE-AKTIVITÄT (EROD).....	- 42 -
5.16	CASPASE-3-AKTIVITÄTSASSAY	- 44 -
5.17	IMMUNFLUORESZENZ.....	- 45 -
5.18	BESTIMMUNG DER RADIKALFÄNGER-EIGENSCHAFTEN VON FLAVONOIDEN MIT HILFE VON 1,1-DIPHENYL-2-PICRYLHYDRAZYL (DPPH)	- 46 -
6	ERGEBNISSE	- 48 -
6.1	BESTIMMUNG DER EXPERIMENTELL EINSETZBAREN KONZENTRATIONEN VON BAP UND FLAVONOIDEN IN CACO-2-ZELLEN	- 48 -

6.1.1	Zytotoxizität von BaP und Flavonoiden	- 48 -
6.2	BAP- UND FLAVONOID-MEDIERTE EFFEKTE IN CACO-2- ZELLEN	- 49 -
6.2.1	Nachweis von BaP- und Flavonoid-medierte DNA-Schäden in Caco-2-Zellen	- 50 -
6.2.2	Einfluss von BaP auf die Regulation der Apoptose in Caco-2-Zellen	- 53 -
6.2.3	Einfluss von BaP und Flavonoiden auf den Zellzyklus in Caco-2-Zellen	- 57 -
6.2.4	Einfluss von BaP und Flavonoiden auf die Expression der Komponenten des AhR-Signalweges in Caco-2-Zellen	- 60 -
6.2.5	Einfluss von BaP und Flavonoiden auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen	- 63 -
6.2.6	Einfluss von BaP und den Flavonoiden auf andere Signalwege in Caco-2-Zellen	- 64 -
6.3	ANTAGONISTISCHES VERHALTEN DER FLAVONOIDE GEGENÜBER BAP-MEDIERTEN EFFEKTEN IN CACO-2-ZELLEN	- 73 -
6.3.1	Flavonoideffekte auf die BaP-medierte DNA-Schädigung in Caco-2-Zellen	- 73 -
6.3.2	Flavonoideffekte auf die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen	- 76 -
6.3.3	Einfluss der BaP-Flavonoid-Kombinationseffekte auf den Zellzyklus in Caco-2-Zellen	- 80 -
6.3.4	Effekte der BaP-Flavonoid-Kombinationen auf die Expression der Komponenten des AhR Signalweges in Caco-2-Zellen	- 84 -
6.3.5	Einfluss von Flavonoiden auf die BaP-induzierte CYP1A1-abhängige Enzymaktivität (EROD) in Caco-2-Zellen	- 87 -
6.3.6	Einfluss von Flavonoiden auf die BaP-medierte Effekten auf die MAPK-, AKT- und Nrf2-Signalwege in Caco-2-Zellen entgegenwirken?	- 88 -
6.4	ABHÄNGIGKEIT DER BAP- UND FLAVONOIDEFFEKTE IN CACO-2-ZELLEN VOM ARYLHYDROKARBON-REZEPTOR-(AHR)-SIGNALWEG	- 98 -
6.4.1	AhR-Abhängigkeit der BaP-induzierten DNA-Schädigung und der hierauf ausgeübte Effekt von Flavonoiden	- 98 -
6.4.2	AhR-Abhängigkeit der BaP- und Flavonoid-induzierten Apoptose in Caco-2-Zellen	- 101 -
6.4.3	AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-medierte Zellzykluseffekten in Caco-2-Zellen	- 105 -
6.4.4	AhR-Abhängigkeit der BaP- und Flavonoid-Effekte auf die Expression von Komponenten des AhR-Signalweges in Caco-2-Zellen	- 112 -
6.4.5	AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekten auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen	- 115 -
6.4.6	AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekte auf relevante Signalwege	- 116 -
6.5	RELEVANZ DER ENTSTEHENDEN BAP-METABOLITE BEI DEN BAP-MEDIERTEN EFFEKTEN IN CACO-2-ZELLEN	- 126 -
6.5.1	Ermittlung der β -Naphthoflavon-medierte Effekte auf CYP1A1 im Vergleich zu BaP in Caco-2-Zellen	- 126 -
6.5.2	Einfluss von β -Naphthoflavon auf die Induktion von DNA-Schäden über die Expression von γ H2Ax in Caco-2-Zellen	- 130 -
6.5.3	Einfluss von β -Naphthoflavon auf die Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen	- 136 -
6.5.4	Relevanz von reaktiven Metaboliten auf Zellzyklus-Effekte in Caco-2-Zellen	- 142 -
6.6	EINFLUSS VON FLAVONOIDEN AUF DIE BILDUNG UND UMWANDLUNG REAKTIVER MOLEKÜLSPEZIES	- 146 -
6.6.1	Hemmung der CYP1A1-abhängigen EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen durch Flavonoide	- 146 -
6.6.2	Hemmung der lebermikrosomalen CYP1A1-abhängigen EROD-Aktivität durch Flavonoide	- 148 -
6.6.3	Flavonoide als Radikalfänger	- 152 -
7	DISKUSSION	- 157 -
8	LITERATUR	- 178 -
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 193 -
10	TABELLENVERZEICHNIS	- 197 -
11	ANHANG	- 198 -
11.1	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNGEN	- 198 -
11.2	DANKSAGUNG	- 199 -
11.3	LEBENS LAUF	- 200 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AhRR	Arylhydrokarbon-Rezeptor Repressor
AKR	Aldoketroreduktase
ARA9/AIP	AhR interagierendes Protein
ARE	Antioxidant-Antwort-Element
ARNT	Arylhydrokarbon nukleärer Translokator
BaP	Benzo[a]pyren
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
Bp	Basenpaare
BPDE	Benzo[a]pyren-diol-epoxid
BSA	Rinderserumalbumin
Caco-2	Kolon Adenokarzinom (Zelllinie)
CKI	Cyclinabhängige Kinase 2 Inhibitor
CLS	Zelllinien Service
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSB	Doppelstrangbrüche
E2F	Transkriptionsfaktor E2F
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EH	Epoxidhydrolase
EPA	Umweltschutz Behörde, USA
Eppi	Reaktionsgefäß von Eppendorf
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	extrazellulär-bezogene-Kinase 1/2
FCS	Fetales Kälberseum
Gclc	Glutamat-cystein Ligase, katalytische Untereinheit
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase-3
GST	Gluthation-S-Transferase
HSP90	Hitze-Schock Protein 90
IF	Immunfluoreszenz
JNK	c-jun-N-terminale Kinase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mM	millimolar
MNF	3-Methoxy-4-nitroflavon
Mrp	Multidrug resistance-related protein
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat. reduziert
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz

NQO1	NAD(P)H-Chinon-Dehydrogenase 1
Nrf2	NF-E2-bezogener Faktor-2
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAS	Per-Arnt Sim
PDK1	PI-abhängige-Kinase 1
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PH	Pleckstrin-Homologie (Domäne)
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3 Kinasen
PIKK	Phosphatidyl-Inositol-3 Kinasen-ähnliche Familie
PIP3	Phosphoinositid-3,4,5-triphosphat
PKB	Protein-Kinase B
PKC	Proteinkinase C
pRB	Retinoblastoma-Protein
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RIPA	Radioimmunoprecipitations-Lysepuffer
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TORC2	mTor-Komplex 2
TUNEL	Terminale Desoxynukleotid Transferase- medierte dUTP-Biotin Nick-Endmarkierung
Txnrd1	Thioredoxin Reduktase 1
XAP2	Hepatitis B-Virus X-aktivierendes Protein
XRE	Xenobiotika-Antwort-Element

1 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit sollte die Fähigkeit verschiedener pflanzlicher Flavonoide zur Prävention von Darmkrebs nachgewiesen werden. Als Testsystem wurden daher humane Kolon-Adenokarzinoma-Zellen (Caco-2), als schädigendes Agens das bekannte Prokarzinogen Benzo[a]pyren, sowie die Flavonoide Galangin, Quercetin, Myricetin und Kaempferol, verwendet.

Da Flavonoiden eine Vielzahl antikarzinogener Eigenschaften zugewiesen werden, wie Hemmung von Phase I-Enzymen, Induktion von Phase II-Enzymen, Induktion der Apoptose, Hemmung der Zellproliferation, antioxidative Wirkung und Modulation des Immunsystems (Watzl & Rechkemmer 2001, Theodoratou et al. 2007, Flis et al. 2012), wurden in dieser Arbeit Effekte von Flavonoiden auf verschiedene Karzinogenese-relevante Prozesse wie DNA-Schädigung, Apoptose, Zellzyklus und damit zusammenhängende Signalwege (AhR, MAPK, Nrf2 und AKT) in Kolon-Adenokarzinoma-Zellen untersucht. Auch die Ausbildung reaktiver Metabolite ist von entscheidender Bedeutung, da Benzo[a]pyrene (BaP) durch die Metabolisierung über Monooxygenasen (Cytochrom P450 (CYP) Enzyme) und Hydrolasen zu dem reaktiven Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid umgewandelt wird. Diese Metabolisierung wird von Benzo[a]pyren selbst initiiert, da es über den Arylhydrokarbon-Rezeptor-(AhR)-Signalweg das relevante, Cytochrom P450 Enzym, CYP1A1 induziert. Auch Flavonoide sind Agonisten des Arylhydrokarbon-Rezeptor-(AhR)-Signalweges, welcher eine tragende Rolle in der Regulation des Fremdstoff-metabolismus im Darm hat.

Nicht nur die generellen Effekte der Flavonoide selbst auf diese Prozesse sondern auch die des Prokarzinogens Benzo[a]pyren (BaP) wurden zunächst untersucht. Die präventiv wirkenden Effekte der Flavonoide wurden auch in Kombination mit dem Prokarzinogen analysiert. Für BaP wurde die Induktion von DNA-Schäden direkt und zudem über die Aktivierung eines spezifischen DNA-Schaden-Markers (γ H2Ax) nachgewiesen. Flavonoide erzeugten generell keine DNA-Schäden in den Kolon-Adenokarzinoma-Zellen, konnten aber die BaP-induzierten DNA-Schäden verhindern. Allerdings zeigten die Flavonoide Quercetin und Myricetin zumindest auf die Aktivierung des DNA-Schaden-Markers (γ H2Ax) einen induzierenden Effekt.

Apoptose wurde in den Kolon-Adenokarzinom-Zellen nur durch Benzo[a]pyren nicht aber durch die Flavonoide induziert. Dies konnte durch verschiedene Apoptose-Parameter bestätigt werden, wie die Caspase-3-Aktivität, das pro-apoptotische

Protein Bax und das anti-apoptotische Protein Bcl-2. Flavonoide wirkten auch der Benzo[a]pyren-induzierten Apoptose entgegen.

Für den Nachweis der Effekte auf den Zellzyklus wurde dieser direkt und anhand verschiedener Komponenten der Zellzyklus-Kontrolle, wie p21, p27, NF κ B, und die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (pRb) untersucht. Generell hatten Benzo[a]pyren und Flavonoide keinen Effekt auf den Zellzyklus und dessen regulierende Komponenten, mit Ausnahme der Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins. Dies konnte sowohl durch Benzo[a]pyren, als auch durch Quercetin signifikant induziert werden. Alle Flavonoide blockierten aber effizient die Benzo[a]pyren-abhängige pRb-Phosphorylierung.

Benzo[a]pyren und Flavonoide hatten Einfluss auf die Signalwege MAPK, Nrf2 und AKT, die Wirkungen waren aber weitestgehend nicht signifikant. Auf den Arylhydrokarbon-Rezeptor-Signalweg konnte ein deutlicher Einfluss von Benzo[a]pyren und Flavonoiden in den Kolon-Adenokarzinom-Zellen festgestellt werden. BaP und Quercetin steigerten signifikant den Level von CYP1A1-mRNA und -Protein, aber auch Galangin und Myricetin übten hierauf einen leicht induzierenden Effekt aus. Die mRNA-Level der Komponenten des AhR-Komplexes (AhR, AhRR und AIP) wurden weder durch Benzo[a]pyren noch durch die Flavonoide beeinflusst, lediglich Myricetin hatte auf das mRNA-Niveau der Komponenten AhR und AhR-Repressor einen signifikant inhibierenden Effekt. Zudem konnten Benzo[a]pyren sowie Flavonoide die CYP1A1-Aktivität in den Kolon-Adenokarzinoma-Zellen deutlich steigern. Jedoch wirkten die Flavonoide auch den Benzo[a]pyren-medierten Effekten auf den Arylhydrokarbon-Rezeptor-Signalweg inklusive der CYP1A1-induktion entgegen. Flavonoide nahmen durch Enzymhemmung auch direkten Einfluss auf die CYP1A1-Aktivität. Detailliertere Untersuchungen zur CYP1A1-Hemmwirkung der Flavonoide mit Lebermikrosomen zeigten, dass ihr Inhibitionspotential mit steigender Zahl an Hydroxylgruppen im B-Ring abnahm, während ihr Radikalfängerpotential zunahm.

Durch den Einsatz einer Arylhydrokarbon-Rezeptor Inhibitors konnte die Abhängigkeit der Flavonoidwirkung auf die einzelnen Karzinogenese-relevanten Prozesse nachgewiesen werden. Hieraus lässt sich generell schließen, dass die Benzo[a]pyren-medierten Effekte und die präventive Wirkung der Flavonoide auf der Beeinflussung des Arylhydrokarbon-Rezeptor-Weges und im Speziellen des Enzyms CYP1A1 basierten.

Die Schlussfolgerung aus allen Ergebnissen ist, dass Flavonoide in Kolon-Adenokarzinom-Zellen einen signifikanten Präventions-Effekt auf BaP-induzierte Karzinogenese-relevante Prozesse besitzen.

2 EINLEITUNG

2.1 Karzinogenese des Dickdarms

Kolorektalkarzinome sind aufgrund ihrer Häufigkeit weltweit mit mehr als einer Million neuer Fälle und ca. 500 000 Toten pro Jahr eines der größten Gesundheitsprobleme dieser Zeit (Comes et al. 2007). Trotz vielversprechender Therapien sterben ca. 50% aller Erkrankten innerhalb der ersten 5 Jahre (Comes et al. 2007). Die Untersuchung molekularer Mechanismen, die zur Dysregulation essentieller zellulärer Prozesse wie Proliferation und Apoptose in Darmkrebszellen führen, trägt dazu bei die Entstehung von Darmkrebs besser zu verstehen sowie Möglichkeiten der Vorbeugung und Therapie zu identifizieren (Comes et al. 2007).

Das **Darmepithel** ist ein komplexes System mit schneller Fluktuation an Zellen. Die Darmepithelzellen sind abgeleitet von Stammzellen, die sich am Ende der Darmkrypten befinden und auf die Oberfläche des Darmlumens übergehen. Während dieser Wanderung proliferieren und differenzieren die Zellen bis zu reifen Kolonzellen (Orchel et al. 2005). In der Literatur wird der Einfluss der Apoptose in diesem Prozess als essentiell beschrieben (Gavrieli et al. 1992, Levy et al. 1994, Strater et al. 1995). Die neoplastische Transformation von Darmepithel ist mit der Dysregulation von zellulärer Differenzierung und Apoptose assoziiert (Orchel et al. 2005). Für die Entstehung von Darmkrebs spielt die genetische Prädisposition eine große Rolle (Gallagher et al. 2010, Peters et al. 2013). Hinzu kommt der Einfluss von Substanzen, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Enthaltene Schadstoffe und Pflanzeninhaltsstoffe können vom Darmepithel resorbiert werden und somit in Kolonzellen direkten Einfluss auf zelluläre Abläufe wie die Zellzyklus-Regulation nehmen.

2.2 Chemisch induzierte Karzinogenese: Benzo[a]pyren

Chemikalien sind als Karzinogene, Prokarzinogene oder Tumorpromotoren maßgeblich an der Entstehung und Entwicklung von Tumoren beteiligt. Viele polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) werden als kanzerogen mit strukturbedingt unterschiedlichem Potenzial eingestuft (IARC 2010). Unter den zahlreichen PAK wird das **Benzo[a]pyren (BaP)** als ein prototypischer Vertreter in

der Literatur beschrieben (Lee & Shim 2007). Es wurde von der International Agency for the Research of Cancer (IARC) 2006 in die Gruppe 1 (bekannte krebserregende Substanz beim Menschen) eingeordnet (IARC 2006). Die International Agency for Research and Cancer (IARC) wurde in den frühen Siebzigern des letzten Jahrhunderts geschaffen, um sich mit der Identifizierung und Einordnung von möglichen krebserzeugenden Chemikalien zu beschäftigen und deren kanzerogene Wirkung auf den Menschen zu untersuchen (Lewtas 2007). PAK sind natürlich vorkommende planare aromatische Verbindungen, die in fossilen Brennstoffen zu finden sind, wie zum Beispiel in Kohle, Öl und Teer. Des Weiteren entstehen sie bei unvollständigen Verbrennungen beispielsweise von Kohle, Holz, Tabak, Diesel als Schadstoffe und können dadurch in der Luft, in Nahrungsmitteln und im Boden vorkommen (Lewtas 2007, Siddens et al. 2012, Ding et al. 2012, Lijinsky 1991, Larsson et al. 1983).

In der Umweltanalytik werden stellvertretend für die Klasse der PAK insgesamt 16 Verbindungen ausgewählt, die sog. EPA-PAK (EPA = Environmental Protection Agency, USA). Hierunter fällt auch das BaP, dessen Konzentration in Umweltproben auch als Marker für eine generelle Belastung mit karzinogen wirksamen PAK verwendet wird (Howard & Fazio 1980, Lee & Shim 2007). Neben der inhalativen Exposition durch Luftverschmutzung wird BaP auch über Nahrungsmittel aufgenommen, wie zum Beispiel über gegrilltes Fleisch (Phillips 1999). Es konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an BaP in unterschiedlichen Lebensmitteln deutlich von Gartemperatur und -zeit abhängt (Kazerouni et al. 2001, Lee & Shim 2007). BaP kann ebenfalls dermal aufgenommen werden (Ramesh et al. 2001, Moody et al. 1995). Offenbar stellt aber die orale Aufnahme von BaP für den Menschen den Hauptaufnahmepfad dar (Nebert et al. 2013, Shi et al. 2010).

Kanzerogene, teratogene und mutagene Wirkungen von PAK erfordern ihre vorherige metabolische Aktivierung zu reaktiveren Metaboliten (Baird et al. 2005, Siddens et al. 2012). Höher anellierte PAK, wie BaP, können ein spezifisches, für ihre Metabolisierung bedeutsames Strukturmerkmal aufweisen, die so genannte „Bay“-Region (Abbildung 1) (Shou et al. 1996, Shimada 2006, Siddens et al. 2012).

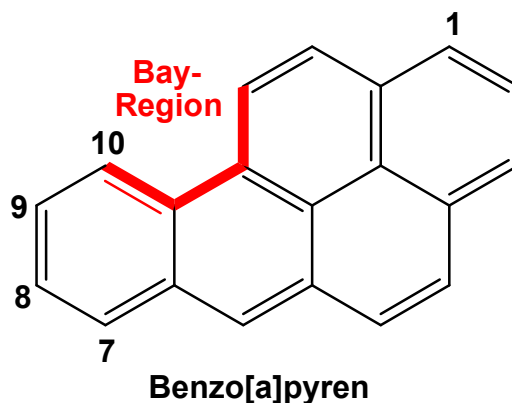


Abbildung 1: Struktur von Benzo[a]pyren (BaP) mit markierter Bay-Region

Im initialen Schritt der Metabolisierung von BaP spielen die P450 Enzyme eine entscheidende Rolle, in dem sie die Epoxygenierung von BaP gegenüber der Bay-Region an den Positionen 7 und 8 durchführen (Shou et al. 1996, Xue & Warshawsky 2005, Shimada 2006, Siddens et al. 2012). Anschließend wird das entstandene Epoxid durch eine Epoxidhydrolase (EH) zum BaP-7,8-dihydrodiol umgesetzt. Durch eine weitere Epoxygenierung entsteht das Endprodukt BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (Bolt & Roos 2008); siehe auch (Shou et al. 1996, Xue & Warshawsky 2005, Shimada 2006, Siddens et al. 2012). Das entstandene Produkt ist in der Lage DNA-Addukte auszubilden und gilt daher als ultimativer kanzerogener Metabolit (Shimada 2006). BaP ist vorrangig für das Verursachen von DNA-Schäden bekannt.

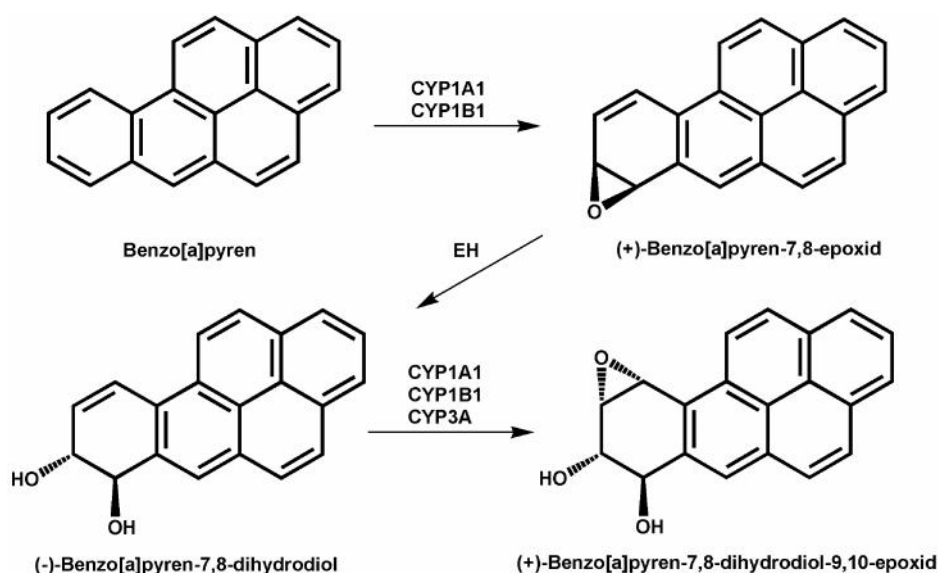


Abbildung 2: Graphische Darstellung des BaP-Metabolismus.

BaP wird über Monooxygenasen (CYP1A1, CYP1B1) und Epoxidhydrolasen (EH) zum mutagenen und kanzerogenen Endprodukt BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) metabolisiert.

2.3 Der Arylhydrokarbon-Rezeptor als Vermittler von BaP-Effekten

BaP entfaltet viele seiner Wirkungen über die Bindung und damit die Aktivierung des Arylhydrokarbon-Rezeptors (AhR), einem ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor (Nebert et al. 2000). Über diesen Mechanismus wird gleichsam auch die Metabolisierung von BaP in Gang gesetzt, indem die entsprechenden schon genannten P450-Enzyme CYP1A1 und CYP1B1 induziert werden.

Der AhR ist bereits seit mehreren Jahrzehnten bekannt und wurde mit großem Interesse toxikologisch betrachtet. Durch seinen Einfluss auf die metabolische Antwort auf PAKs und polychlorierte Dioxine rückte der AhR in den Mittelpunkt des Interesses zur Aufklärung des PAK Metabolismus (Schmidt & Bradfield 1996). Der stärkste bekannte Agonist des AhR ist das 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), welches als Seveso-Gift seit dem Unglück in der norditalienischen Stadt Seveso (1976) bekannt wurde, bei dem größere Mengen an TCDD freigesetzt wurden (Sandermann 1984). Der AhR ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor der zur Familie der bHLH/PAS-Proteine (basic-Helix-Loop-Helix/Per Arnt Sim) gehört (Gu 2002, Bock & Kohle 2006). Er ist in seiner Funktion mit der Detoxifizierung von Endo- und Xenobiotika, sowie der Regulation der organspezifischen toxischen Antwort auf Dioxine, verknüpft (Bock 1993).

Der AhR ist ein löslicher, zytosolisch lokalisierter Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von ca. 280 kDa (Hoffman et al. 1991, Schmidt et al. 1996, Carlson & Perdew 2002, Hankinson 2005, Nukaya et al. 2010). Im ligandenfreien Grundzustand liegt der AhR im Komplex mit einem Hsp90-Dimer, mit dem Chaperon p23 und dem AhR-interacting-Protein vor (AIP = ARA9 = XAP2/Hepatitis B Virus X-activating protein-2) (Schmidt et al. 1996, Levine & Perdew 2001, Gu 2002, Bock & Kohle 2006, Verma et al. 2012). Die Bindung des Hsp90-Dimers erfüllt die Aufgabe der Konformationsstabilisierung und damit der Ligandenbindungsfähigkeit des AhR (Levine & Perdew 2001).

Die Aufgaben der anderen Rezeptorkomplexparker sind noch nicht vollständig geklärt. Durch ARA9 könnte die Signaltransduktion verstärkt werden. Vermutlich basiert diese Fähigkeit des ARA9 auf seiner Rolle als zelluläres Chaperon, das den AhR stabilisieren kann - auch unter Hitze-Stress (LaPres et al. 2000, Carlson & Perdew 2002, Nukaya et al. 2010). Der XAP2-Hsp90 Komplex agiert in der Abwesenheit von AhR Liganden als negativ regulierender Komplex, indem es den AhR vor dem proteolytischen Abbau schützt (Meyer & Perdew 1999, Lees et al.

2003, Flaveny et al. 2009). XAP2 scheint nicht für die AhR Signalwirkung benötigt zu werden (Hollingshead et al. 2004), sondern verhindert den Transport des ligandenfreien AhR vom Zytosol in den Nukleus (Petrulis et al. 2003).

Durch ein genetisches Hefe-Modell wurde gezeigt, dass p23 für die Potenz und die Effizienz der Liganden-induzierten AhR Signalwirkung nötig ist (Cox & Miller, III 2002, Cox & Miller, III 2004). Aus Experimenten mit p23 knockdown-Mäusen wurde geschlossen, dass p23 in der Leber nicht für die Proteinstabilität des AhR oder für eine kompetente Ligandenbindung notwendig ist (Flaveny et al. 2009). Offenbar wird p23 aber benötigt, um AhR-ARNT-DNA Komplexe auszubilden. Dieser Prozess wurde *in vitro* in Abhängigkeit von Hsp90 detektiert (Shetty et al. 2003). Bereits 1999 wurde postuliert, dass der p23-HSP90-Komplex in der Lage ist, den Transport vom AhR vom Zytosol in den Nukleus via Importin zu regulieren (Kazlauskas et al. 2001, Flaveny et al. 2009). Die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) des AhR befindet sich im N-terminalen Bereich (Ikuta et al. 1998, Kazlauskas et al. 2001). Importin bindet an die NLS des AhR und dockt dann im Komplex an die zytoplasmatische Seite der Kernpore an. Durch die mittels Ligandenbindung (z.B. BaP/Dioxine oder ggf. auch Flavonoide) hervorgerufene Konformationsänderung des AhR-Komplexes werden die Rezeptor-assoziierten Proteine freigesetzt und die NLS Sequenz des AhR wird zugänglich (Ikuta et al. 1998).

Der aktivierte AhR wird in den Nukleus transloziert und bindet an seinen Dimerisierungspartner ARNT (Hoffman et al. 1991, Hoffman et al. 1991, Schmidt et al. 1996, Bock & Kohle 2006, Verma et al. 2012). ARNT (aryl hydrocarbon- oder auch Ah-receptor-nuclear-translocator) bildet mit dem AhR ein Heterodimer aus (Schmidt et al. 1996, Levine & Perdew 2001, Bock & Kohle 2006, Verma et al. 2012). Im Gegensatz zum AhR ist ARNT ein konstitutiv nukleäres Protein (Hord & Perdew 1994). Das ARNT-Protein gehört wie der AhR ebenfalls zu den bHLH/PAS-Proteinen und ist für die Regulierung von zellulären Prozessen durch Homo- oder Heterodimerisierung mit anderen bHLH/Pas Familienmitgliedern verantwortlich (Levine & Perdew 2001). Für die Dimerisierung mit dem Ah-Rezeptor werden beide Domänen, bHLH und auch PAS benötigt. ARNT kann am Serin 348 in der PAS-Region phosphoryliert werden, was aber offenbar keine Rolle für die Dimerisierung mit dem AhR spielt (Levine & Perdew 2001).

Es wurden bisher mehrere mögliche Folgewege der Aktivierung des AhR erforscht.

(1) Durch die Dimerisierung kann der AhR an spezifische DNA Sequenzen stromaufwärts des CYP1A1-Gens binden, sogenannte XRE (xenobiotic response element). Die XRE-Sequenz ist eine Heptanukleotid-Sequenz (5'-T(C/T)GCGTG-3'), die für die Expression der Zielgene verantwortlich ist (Swanson et al. 1995).

Das an die DNA gebundene AhR/ARNT-Dimer rekrutiert Kofaktoren und moduliert die Transkription von AhR Zielgenen, wie zum Beispiel CYP1A1, welches den BaP-Metabolismus initiieren kann (Hoffman et al. 1991, Levine & Perdew 2001, Karchner et al. 2002, Bock & Kohle 2006). Die Zielgene des AhR sind Phase I und II Enzyme. Aber es werden auch Gene abgelesen, die in die Regulation der Proliferation, Differenzierung und Entwicklung involviert sind. Der aktivierte AhR wird direkt wieder in das Zytosol zurück transportiert und durch das 26S-Proteasom abgebaut, um eine permanente Aktivierung zu verhindern (Mahon & Gasiewicz 1995, Ma et al. 2009). Zusätzlich wurde eine direkte Interaktion des AhR mit dem Retinoblastoma-Protein (Rb-Protein) und NFκB identifiziert (Nebert & Gonzalez 1987, Rushmore & Pickett 1990, Jaiswal 1991, Hoffer et al. 1996, Kolluri et al. 1999, Mimura et al. 1999, Matikainen et al. 2001, Cho et al. 2004, Barnes-Ellerbe et al. 2004, Miao et al. 2005, Bock & Kohle 2006).

In eukaryotischen Zellen spielen posttranslationale Modifikationen eine entscheidende Rolle in der Proteinfunktion und der Regulierung der Genexpression (Puga et al. 2002, Henklova et al. 2008). Der AhR selbst besitzt eine große Anzahl möglicher Phosphorylierungsstellen, welche jedoch wenig Bedeutung für dessen Aktivierung spielen (Ma et al. 2009). Es gibt jedoch Hinweise, dass die Phosphorylierungen des AhR für die DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität benötigt wird (Pongratz et al. 1991, Carrier et al. 1992, Long et al. 1998). Eine besondere Rolle für die AhR-Aktivität spielt die Proteinkinase C (PKC) (Carrier et al. 1992, Chen & Tukey 1996, Long et al. 1998). Bei einer spezifischen Inhibition der PKC wird die ligandeninduzierte Bindung des AhR/ARNT Komplexes blockiert und die Expression von CYP1-Genen unterdrückt (Carrier et al. 1992, Long et al. 1998). Der zugrunde liegende Mechanismus, wie die PKC die AhR-Aktivität reguliert, ist noch unklar (Ma et al. 2009).

Der Einfluss von Serin/Threonin Phosphatasen auf den AhR wurde in mehreren Studien gezeigt. Eine Inhibierung der Ser/Thr Phosphatasen führt zu einer gesteigerten AhR-vermittelten Genexpression (Li & Dougherty 1997). Diese zytosolischen Phosphatasen sind mit Hsp90 Komplexen assoziiert (Pratt 1997). Der

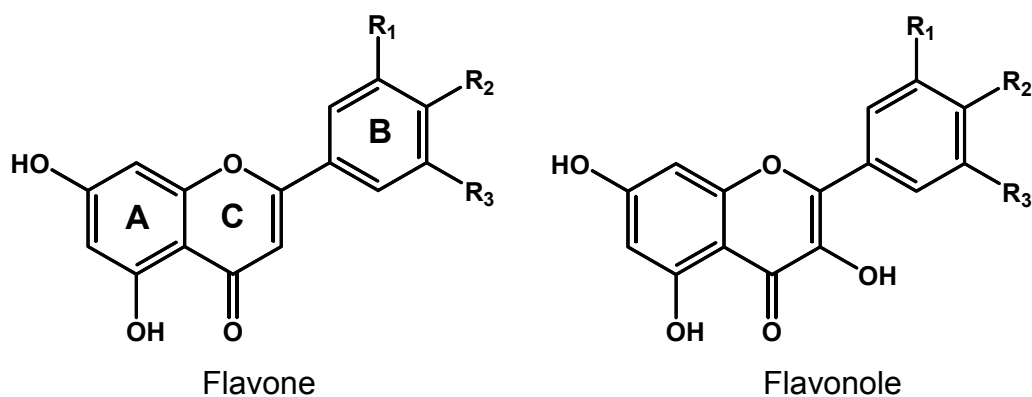
Hsp90-Komplex ist im Zytosol an den AhR gebunden, eine Phosphorylierung des Komplexes führt zu einer Konformationsänderung, die dem AhR den Transport in den Nukleus ermöglicht (Tan et al. 2004).

2.4 Weitere Liganden des AhR: Flavonoide

Neben TCDD und PAK hat der AhR auch natürlich vorkommende Liganden, darunter auch sekundäre Pflanzenstoffe wie bestimmte Flavonoide (Ciolino et al. 1999, Zhang et al. 2003). **Flavonoide** umfassen mehr als 4000 Substanzen aus der Gruppe der Polyphenole, die in nahezu allen essbaren Pflanzen zu finden sind (Ren et al. 2003). Dementsprechend gelangen sie über Gemüse, Früchte und Tee sowie deren Folgeprodukte, wie Säfte, als Aglykone oder als Flavonoidglykoside (Watzl & Rechkemmer 2001) in den menschlichen Organismus. Die tägliche Aufnahme liegt in den Bevölkerungen von Europa und den USA zwischen ca. 0,1 – 1 g (Araujo et al. 2011).

Den Flavonoiden wird nachgesagt, dass sie in der Lage sind den adversiven Effekten von Giften und Prokarzinogenen entgegen zu wirken. Ihnen werden anti-inflammatorische, anti-karzinogene, anti-allergische, anti-thrombotische sowie anti-diarrhoische Wirkungen zugeschrieben (Bravo 1998, Nijveldt et al. 2001, Middleton E Jr et al. 2000, Scalbert et al. 2005, Lauren et al. 2009).

Der Mechanismus der antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide ist auf direkte Radikalfängereigenschaften der Flavonoide zurückzuführen, aber auch auf die Inhibition ROS (reaktive Sauerstoff Spezies)-produzierender Enzymen (Terao 2009). Flavonoide besitzen eine Phenylbenzopyron-Struktur (C6-C3-C6) und werden anhand struktureller Eigenschaften im C-Ring in verschiedene Gruppen eingeteilt, wie Flavone, Flavanole, Flavonole, Flavanone, Flavanonole und Isoflavone (Ren et al. 2003).



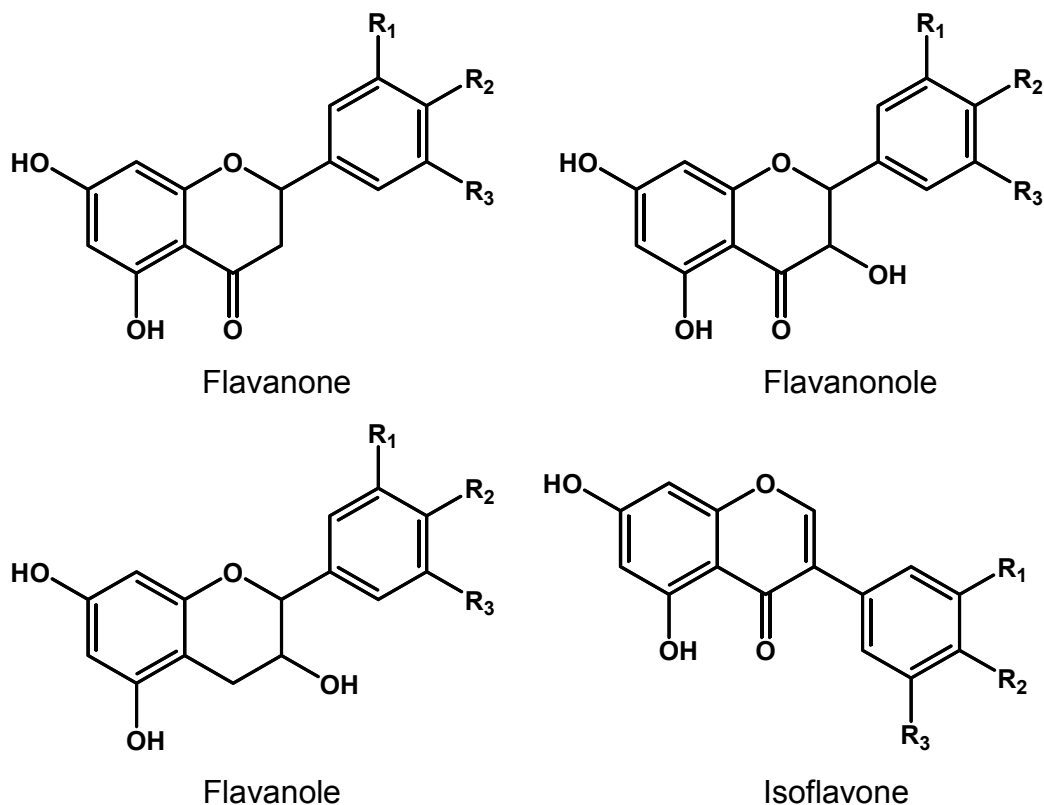


Abbildung 3: Gruppierung der Flavonoide und ihre chemische Struktur R₁, R₂, R₃ = H oder OH.

Die für die Radikalfängereigenschaften essentiellen Teilstrukturen sind identifiziert worden und umfassen zum Beispiel die phenolische Hydroxylgruppe in 4'-Position des B-Rings (R₂ in Abbildung 3) (Terao 2009).

In Tierversuchen zeigten verschiedene Flavonoide speziesabhängige, anti-karzinogene Effekte. Mögliche Einflüsse der Flavonoide umfassen die Hemmung von Phase I Enzymen, Induktion von Phase II Enzymen, Wechselwirkung mit der DNA, Induktion der Apoptose, Hemmung der Zellproliferation, antioxidative Wirkung oder die Modulation des Immunsystems (Watzl & Rechkemmer 2001, Flis et al. 2012).

Aufgrund dieser Eigenschaften wird postuliert, dass Flavonoide in der Krebsprävention eingesetzt werden können (Chao et al. 2007, Araujo et al. 2011, Romagnolo & Selmin 2012).

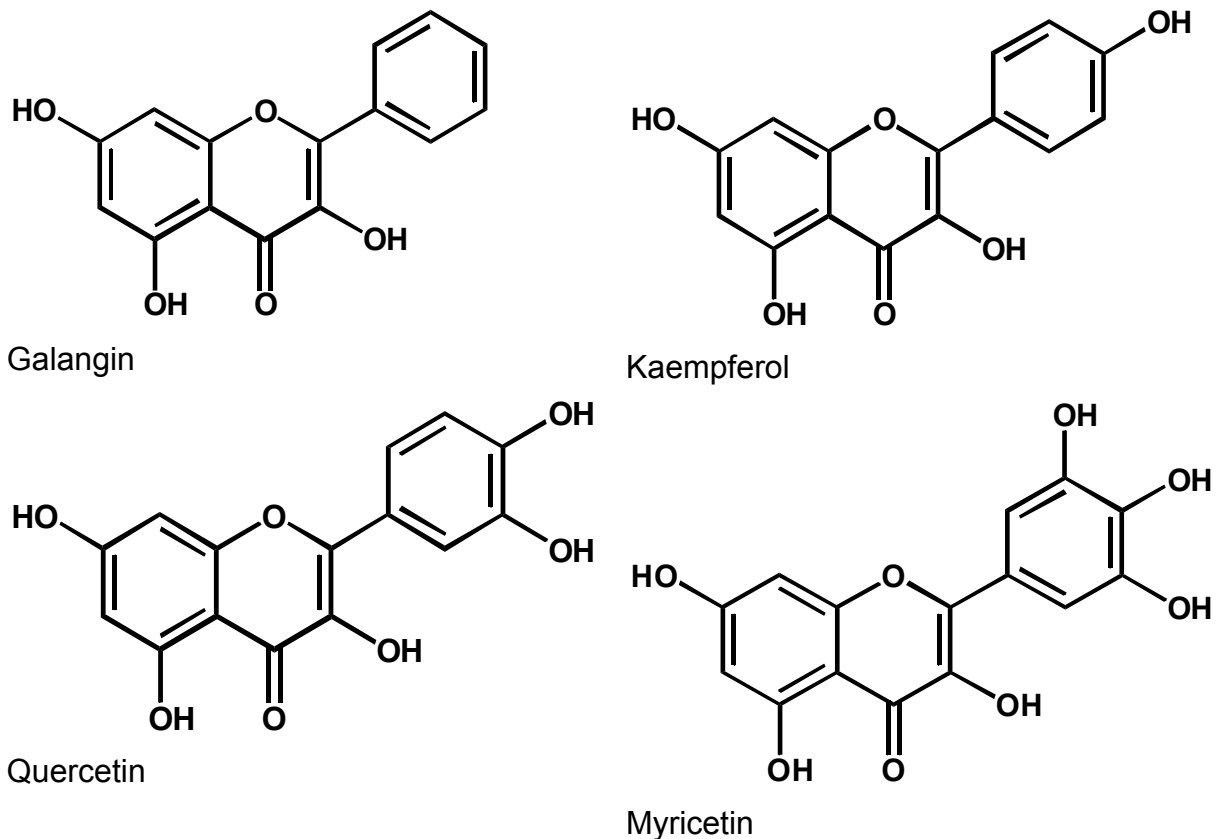


Abbildung 4: Struktur der verwendeten Flavonoide aus der Gruppe der Flavonole.

2.5 Benzo[a]pyren und die DNA-Schadenskontrolle - γ H2Ax

H2Ax ist ein Protein aus der Gruppe der Histone, die essentielle Bestandteile des Chromatins sind. Histone sind hochkonserviert und stabilisieren die DNA, indem sie mit den DNA-Molekülen und weiteren Proteinen Nukleosome bilden (Bartova et al. 2008). Innerhalb eines Nukleosoms befinden sich 147 Basenpaare der DNA, die 1,7 fach um den zentralen Kern von acht Histon-Protein-Molekülen gewickelt ist (Fernandez-Capetillo et al. 2004). Es sind fünf Hauptklassen der Histone bekannt: H1, H2A, H2B, H3, H4 (Luger et al. 1997). Das genetische Potential der DNA kann über epigenetische Modifikationen, wie Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitylierung und ADP-Ribosylierung an hochkonservierten Kernhistonen (H2A, H2B, H3, H4) beeinflusst werden (Bartova et al. 2008).

Das H2Ax ist eine elektrophoretisch identifizierbare Isoform des Kernhistons H2A (West & Bonner 1980) und stellt eine wichtige H2A-Gruppe dar. Der Anteil des H2Ax im gesamten H2A-Pool von Säugetieren beträgt 2-25%, abhängig von Zellart oder Gewebe (Rogakou et al. 1998, Cohen et al. 1975, Redon et al. 2002). Wie andere Mitglieder der H2A-Familie kann auch H2Ax am Ser1 phosphoryliert, am Lys5 acetyliert und am Lys119 ubiquityliert werden (Wu et al. 1986, Fernandez-Capetillo

et al. 2004). Die Besonderheit des H2Ax ist ein hochkonservierter Serinrest am COOH-Terminus. Dieses Ser139 kann schnell phosphoryliert werden, sobald ein DNA-Schaden in Form von Strangbrüchen in den Zellen erfolgt (Rogakou et al. 1998, Fernandez-Capetillo et al. 2004). Die Phosphorylierung des Ser139 als Schadensantwort erfolgt durch Kinasen der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinases-like-Familie (PIKK) (Fernandez-Capetillo et al. 2004).

Basierend auf der schnellen Induktion und dem 1:1 Verhältnis von γ -H2Ax Foci zu Doppelstrangbrüchen, wurde γ -H2Ax als Marker für Doppelstrangbrüche (DSB) eingesetzt (Sedelnikova et al. 2002).

Es konnte ermittelt werden, dass H2Ax mehrere Aufgaben bei der DNA-Reparatur, der Instandhaltung der Chromosomen und im Zellzyklus besitzt (Fernandez-Capetillo et al. 2004, Rogakou et al. 1998, Franco et al. 2006, Fragkos et al. 2009). In einer Studie von 2004 konnte gezeigt werden, dass H2Ax null-Mäuse nach niedrig dosierter UV-Strahlung nicht mehr in der G2-M-Phase arretieren konnten (Fernandez-Capetillo et al. 2004).

Zur Rolle des γ -H2Ax in der DNA-Reparatur sind zwei Hypothesen entstanden. Erstens steigt durch die Aktivierung des γ -H2Ax die Wahrscheinlichkeit der Assemblierung eines Reparaturkomplexes durch lokale Konzentrationserhöhung von Reparaturfaktoren, wobei γ -H2Ax als Dockingstelle für die Reparationsfaktoren dient. Die zweite Möglichkeit ist eine durch γ -H2Ax induzierte Reorganisation des Chromatins. Hierbei sollen die γ -H2Ax Foci die gebrochenen DNA-Enden näher aneinander bringen (Fernandez-Capetillo et al. 2004).

BaP ist bekannt dafür stabile DNA-Addukte auszubilden, Strangbrüche zu induzieren sowie Zellzyklusarrest und Apoptose hervorzurufen (Melendez-Colon et al. 1999, Binkova et al. 2000, Solhaug et al. 2004, Tekpli et al. 2010). Um die durch BaP hervorgerufenen DSB zu detektieren wurde γ -H2Ax bereits in mehreren Studien verwendet. Zur Überprüfung, ob BaP selbst γ -H2Ax induziert oder ob die vorgeschalteten Kinasen beeinflusst werden, wurden verschiedene Inhibitoren verwendet. Die PI3K wurde durch Koffein und Wortmannin inhibiert und nur bei Hela-Zellen konnte die Phosphorylierung von H2Ax hiermit verhindert werden (Yan et al. 2011).

Der Einfluss von γ -H2Ax und BaP auf den Zellzyklus wurde durch Yan et al. 2011 untersucht. Hierbei konnte eine S-Phasen-abhängige Induktion von γ -H2Ax durch BaP nachgewiesen werden (FACS-Messungen) (Yan et al. 2011).

Laut Literatur korrelieren auch Polymorphismen von Genen des DNA-Reparatur-Systems mit der Entstehung von kolorektal Krebs (Michailidi et al. 2012).

2.6 Der Arylhydrokarbon-Rezeptor und Apoptose

Apoptose ist ein in multizellulären Organismen zum Zelltod führender biologischer Prozess, der an morphologischen und biochemischen Veränderungen kenntlich ist. Solche Veränderungen sind die Erzeugung von apoptotischen Blasen, Zellschrumpfen, eine nukleäre Fragmentierung, Chromatin-Kondensation und chromosomale DNA-Fragmentierung. All diese Veränderungen führen zum programmierten Zelltod (Apoptose) (Ma et al. 2009).

Eine Inhibition der Apoptose ist ein bereits bekannter Prozess der Tumor-Promotion. Der bisher bekannteste und potenteste Tumorpromotor ist TCDD (Bock & Kohle 2005, Ma et al. 2009). Es konnte in einer Leber-Tumor-Promotionsstudie gezeigt werden, dass TCDD in der Lage ist durch die Inhibition der Apoptose eine klonale Expansion hervorzurufen. Dies ging einher mit einem AhR-abhängigen Zellzyklus-Arrest (Bock & Kohle 2005). Es werden in der Literatur verschiedene Vermutungen über den Einfluss des Liganden-aktivierten AhR auf die Apoptose angestellt. Zum einen wurde angenommen, dass durch die AhR-medierte Induktion des CYP1A1 oxidativer Stress entsteht, der letztendlich für die Initiierung der Apoptosekaskade maßgeblich sein könnte (Nebert et al. 2000).

(A) Diese These wird durch eine Studie unterstützt, in der Maus-Hepatoma-Zellen (HepG2) mit BaP exponiert wurden und die daraus resultierende Apoptose in Verbindung mit der Aktivierung des AhR und der daraus resultierenden Induktion von CYP1A1 stand. (B) Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die MAP-Kinase p38 eine wesentliche Rolle in der Aktivierung der Apoptose spielt (Nebert et al. 2000, Chen et al. 2003). (C) Durch die Aktivierung der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenase, CYP1A1, wird die Entstehung des ultimativen Kanzerogens BPDE (BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid) initiiert.

2.7 Der Arylhydrokarbon-Rezeptor und Zellzyklus

Die Aktivierung des AhR durch BaP oder andere z.B. hochaffine Liganden führt zu Zellzyklusveränderungen, wie zum Beispiel G0/G1 und G2/M Phasenarrest (Marlowe & Puga 2005, Ma et al. 2009). Des Weiteren kann es zu einer Inhibierung der Proliferation kommen (Ma et al. 2009).

Im Laufe der Zeit wurde erkannt, dass der AhR verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen kann, die im Zusammenhang mit Proliferation, Differenzierung und Apoptose stehen. Der Einfluss des AhR basiert zunächst auf der ligandenabhängigen Aktivierung durch Xenobiotika, aber auch andere Aktivitäten des AhR scheinen eine zunehmende Rolle zu spielen. Hierbei ist jedoch nicht bekannt, ob diese Aktivitäten ligandenabhängig sind (Puga et al. 2009).

Dem AhR wird zudem auch eine Rolle in der Zellzykluskontrolle zugesprochen (Levine-Fridman et al. 2004). Diese These konnte durch mehrere Studien unterstützt werden, so fanden Ma und Whitlock 1996, dass in einer AhR-defizienten Hepatoma-Zelllinie der Maus der Durchlauf der G1-Phase verzögert ist (Ma & Whitlock, Jr. 1997). Embryonale Fibroblasten (MEFs) von AhR-null-Mäusen zeigen ein verlangsamtes Zellwachstum, wodurch sie in der G2/M-Phase akkumulieren, potenziell ausgelöst durch eine veränderte Expression der G2/M Cdc2-Kinase und der PIK (Phosphatidyl-Inositol-Kinase) (Elizondo et al. 2000).

Es wird vermutet, dass die Abwesenheit von exogenen Liganden des AhR den Zellzyklusprozess fördert. Eine Konzentration von unter 10 pM des exogenen Agonisten TCDD inhibiert die DNA-Replikation und die Zellproliferation in konfluenten Mausepithel Zellkulturen (Gierthy & Crane 1984).

TCDD verursacht einen G1-Phase Zellzyklus Arrest in Ratten Hepatomazellen (AhR positiv) (Gottlicher et al. 1990). Durch den Zellzyklus-Arrest wird die Expression des CKI p27/kip1 gesteigert (Cyclin-abhängige-Kinase-2-Inhibitor), welcher die CDK2-Aktivität inhibiert und dadurch der Übergang in die S-Phase erschwert. Das Hauptziel der CDK2-Aktivität ist das Retinoblastoma-Protein (pRb) (Sherr & Roberts 1999). Dieses ist ein 110 kd nukleäres Phosphoprotein, welches während des Zellzyklus zyklisch phosphoryliert und dephosphoryliert wird (Jacks & Weinberg 1998, Ge & Elferink 1998). Die hypophosphorylierte Form des pRb ist die aktive Form, welche die Zellen zum G1-Arrest führt, da in diesem Zustand das pRb den Transkriptionsfaktor E2F bindet und so die Transkription, der für den Übergang in die S-Phase benötigten Gene, verhindert. Eine Hyperphosphorylierung durch Cyclin-abhängige-Kinasen (CDK) inaktiviert das pRb und der Übergang der Zellen von der G1- zur S-Phase kann stattfinden, da der Transkriptionsfaktor E2F nicht mehr am pRB gebunden ist und somit die Transkription der benötigten Gene induzieren kann (Whyte et al. 1988, Lundberg & Weinberg 1998, Ge & Elferink 1998).

2.8 Zusammenspiel des Arylhydrokarbon-Rezeptors mit anderen Signalwegen

2.8.1 Die MAPK-Signalwege

Der AhR übernimmt durch transkriptionelle Aktivierung von CYP1-Genen eine entscheidende Rolle in der Detoxifizierung von Xenobiotika, indem er über eine Liganden-abhängige Aktivierung die Metabolisierung der Liganden selbst initiiert (siehe 2.3). Es hat sich gezeigt, dass der AhR nicht nur in Detoxifizierungsprozesse eingebunden ist, sondern darüberhinaus auch eine kritische Rolle im Zellzyklus und der Mitogen-aktivierten Signalkaskaden spielt und im Zusammenspiel mit dem E2F/pRb Signalweg steht.

Die Familie der **Mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK)**. Man unterscheidet drei MAPK Familien, die „extracellular signal regulated kinases“ (**ERK1/2**), die „c-jun N-terminal/stress activated protein kinase“ (**JNK/SAPK**) und **p38**. Diese drei Familien sind wichtige intrazelluläre Mediatoren der Signaltransduktion (Ma et al. 2009). MAPK sind maßgeblich an der Kontrolle der Genexpression beteiligt, indem sie die Funktion von Transkriptionsfaktoren durch deren Phosphorylierung steuern. Die MAPK selbst werden über MAPKKK-MAPKK Signalkaskaden aktiviert und kontrolliert (Cobb & Goldsmith 2000, Ma et al. 2009).

Die genannten MAPK (ERK1/2, JNK und p38) regulieren verschiedene Prozesse in der Zelle. ERK1/2 ist bekannt dafür in die Regulation von Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung einzugreifen (Garnett & Marais 2004). Die Kinase p38 wird z.B. über Tumornekrose-Faktoren aktiviert und besitzt vier Isoformen, welche in Antwortprozesse von Entzündungen, Apoptose und Zellzyklus eingreifen können (Seger & Krebs 1995, Pearson et al. 2001). Die dritte MAPK Familie, die JNK, wird vorwiegend über Stress induziert. Sie besitzt drei Isoformen, welche in zelluläre Signalkaskaden, stressinduzierte- und programmierte Apoptose und in die Karzinogenese eingreifen. Zusätzlich wird beschrieben, dass sie Einfluss auf das Immunsystem besitzt und an der Pathogenese von Diabetes beteiligt ist (Weston & Davis 2007).

2.8.2 Der AKT (PKB)-Signalweg

AKT, auch Proteinkinase B genannt (PKB), gehört zur AGC Familie der Proteinkinasen, welche nach den Proteinkinasen A, C und G benannt wurde (Gilot et al. 2010). In der AKT Familie existieren drei Mitglieder (AKT1, 2 und 3) (Bellacosa et al. 1998). AKT ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, die selbst über eine Kinase, die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), aktiviert werden kann (Vivanco & Sawyers 2002, Gilot et al. 2010). PI3K ist eine Lipid-Kinase, die regulatorische Schlüsselrollen in vielen zellulären Prozessen besitzt, wie Überleben, Proliferation und Differenzierung von Zellen (Vivanco & Sawyers 2002). Sie kann über verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden und die von Wachstumsfaktoren und Zytokinen erhaltenen externen Signale werden über die Bildung spezifischer Phospholipid-Derivate intrazellulär weitergegeben (Vivanco & Sawyers 2002). Für den AKT-Signalweg sind im speziellen die Phospholipide Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) und Phosphoinositol-3,4-bisphosphat für die Aktivierung zuständig (Gilot et al. 2010). Diese rekrutieren AKT und binden letztlich an die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) und führen zu einer AKT-Konformationsänderung. AKT wird über die PI-abhängige Proteinkinase-1 durch Phosphorylierung am Thr308 und eine zweite am Ser473 aktiviert (Alessi & Cohen 1998, Bellacosa et al. 1998, Gilot et al. 2010). Eine andere Möglichkeit der Aktivierung erfolgt an der Membran, wo eine weitere PH-Domäne-besitzende Kinase, die 3-Phosphoinositol-abhängige Proteinkinase-1 (PDK1) AKT, ebenfalls am Thr308, phosphoryliert (Vanhaesebroeck & Alessi 2000). Um jedoch eine maximale Aktivierung von AKT zu erreichen muss eine zweite Phosphorylierung am Ser473 erfolgen, diese wird über die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-2 (PDK2) reguliert (Stokoe et al. 1997).

Durch diese Aktivierung werden nun nachgeschaltete Kinasen aktiviert, wie der Rapamycin-insensitive mTOR-Komplex-2 (TORC2) (Alessi & Cohen 1998, Cantley 2002) oder die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3 α,β), welche außer im Glykogen-Stoffwechsel laut neueren Erkenntnissen auch in Prozesse der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und des Zellüberlebens involviert ist (Cohen & Frame 2001, Frame & Cohen 2001, Beurel & Jope 2006, Russo et al. 2013). Eine Phosphorylierung am Serin der GSK-3 unterdrückt deren Kinase-Aktivität. Diese Unterdrückung wird durch den AKT-Signalweg mediert (Shaw et al. 1997, Russo et al. 2013).

Durch die PI3K-abhängige AKT-Aktivierung können viele Wachstumsfaktoren, wie der EGF (Epidermaler-Wachstumsfaktor) und Insulin, die Aktivität von AKT in normalen Zellen induzieren (Cantley 2002).

Der Tumorsuppressor PTEN (Phosphatase und Tensin-Homolog) ist der wichtigste negative Regulator des PI3K- und damit auch des AKT-Signalweges. Das Enzym katalysiert die Dephosphorylierung an der C3-Position der Phosphoinositide (Cantley & Neel 1999, Cully et al. 2006).

AKT rückte in den Fokus der Betrachtung durch seine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferation und Zellüberleben. In einem breiten Spektrum humaner Krebsarten sind Komponenten des PI3K-AKT-Signalweges dysreguliert (Vivanco & Sawyers 2002).

Der AKT/PKB-Signalweg kann über den AhR moduliert werden (Marlowe & Puga 2005). Wie bereits in 2.6 beschrieben wurde, wird dem AhR eine maßgebliche Rolle in der Regulation der Apoptose zugeschrieben. Diese Rolle wird hauptsächlich über die AhR-Aktivierung mittels exogener Liganden, wie TCDD, induziert. Hier liegt die Schnittstelle zur Einbindung des AKT/PKB-Signalweges, welcher die Überlebenssignale der Zelle durch Wachstumsfaktoren über den AKT/PKB-Signalweg verarbeitet (Hengartner 2000, Wu et al. 2007). In einer Studie aus 2007 konnte gezeigt werden, dass der AhR eine protektive Rolle in der Ausbildung der Apoptose spielt, wenn diese durch äussere Faktoren mediert wurde, wie UV-Strahlung oder H₂O₂. Des Weiteren konnte in einer Studie von 2010 gezeigt werden, dass durch die Aktivierung des AhR über BaP eine Phosphorylierung von AKT in Osteoblasten erfolgt (Gilot et al. 2010).

2.8.3 Der Nrf2-Signalweg

Nrf2 (NF-E2-related Faktor-2) ist ein Transkriptionsfaktor, der während der oxidativen Stressantwort eine zentrale Rolle in der Expression verschiedener zytoprotektiver Gene spielt (Itoh et al. 1997). Die Regulation und Aktivierung des Nrf2 erfolgt über keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) und unter normalen Konditionen wird Nrf2 konstant über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut. Dieser konstante Nrf2-Abbau wird über das keap1 Homodimer reguliert, zwei Moleküle keap1 sind mit einem Molekül Nrf2 verbunden. Diese zweiseitige Bindung scheint kritisch für die Ubiquitylierung des Nrf2 zu sein (Sekhar et al. 2002, McMahon et al. 2003, Kobayashi et al. 2004). Beim Auftreten von oxidativem Stress wird die Regulierung

des Nrf2 via keap1 unterbunden, da dieses abdissoziiert und dadurch Nrf2 stabilisiert und dann in den Nukleus transloziert wird. Im Nukleus heterodimerisiert Nrf2 mit kleinen Maf-Proteinen und aktiviert die Zielgene über das Antioxidant/Elektrophile-Antwort-Element (ARE) (Itoh et al. 1997). Der Nrf2-Protein-Level wird demnach über den Abbauprozess und die Stabilisierung bei oxidativem/elektrophilem Stress reguliert (Taguchi et al. 2011). Die Zielgene des Nrf2 Signalweges sind involviert in (1) die Gluthathion-Synthese [Bsp. Glutamat-Cystein Ligase, katalytische Unter-einheit (Gclc)], (2) die Eliminierung von ROS [Thioredoxin Reduktase 1 (Txnrd1)], (3) die Detoxifizierung von Xenobiotika [NAD(P)H Chinon-Dehydrogenase 1, (NQO1), Gluthation-S-Transferase (GST)] und (4) Pharmaka-Transport [multidrug-resistance-associated protein (Mrp) gene family] (Okawa et al. 2006, Yates et al. 2009).

In verschiedenartigen humanen Tumoren wurden Mutationen in den keap1- und Nrf2-Genen gefunden (Taguchi et al. 2011), die als Folge die keap1-Nrf2-Komplexierung unterbinden und somit Ubiquitinylierung und Abbau von Nrf2 beeinflussen. Dies führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Nrf2. Die erhöhte Expression von Nrf2-Zielgenen verschafft normalen- und Krebszellen einen Vorteil über Stressresistenzen und Zellproliferation (Yates et al. 2009, Taguchi et al. 2011).

Über die Expression des Zielgens NQO1 kann eine Verbindung des AhR- und Nrf2-Signalweges hergestellt werden, da beide Signalwege zur Transkription des NQO1-Gens führen können (Kann et al. 2005, Yeager et al. 2009, Wang et al. 2013).

In mehreren Studien wurde die Verbindung zwischen dem AhR und Nrf2 untersucht, so wurde ermittelt, dass die Aktivierung des AhR-Signalweges über Xenobiotika, wie TCDD oder BaP zu einer signifikanten Steigerung des Nrf2-mRNA-Levels führt. Wenn jedoch der AhR mittels „Silencing“ oder knock-out ausgeschaltet wurde, sind die gleichen Xenobiotika nicht mehr in der Lage die Nrf2-mRNA zu steigern (Miao et al. 2005, Yeager et al. 2009, Vondracek et al. 2009).

3 ZIEL DER ARBEIT

Kolorektalkarzinome sind aufgrund ihrer Häufigkeit weltweit mit mehr als einer Million neuer Fälle und ca. 500000 Toten pro Jahr eines der größten Gesundheitsprobleme dieser Zeit. Trotz vielversprechender Therapien sterben ca. 50% aller Erkrankten innerhalb der ersten 5 Jahre. Die Untersuchung molekularer Mechanismen, die zur Dysregulation essentieller zellulärer Prozesse wie Proliferation und Apoptose in **Darmkrebszellen** führen, trägt dazu bei, die Entstehung von Darmkrebs besser zu verstehen sowie Möglichkeiten der Vorbeugung und Therapie zu identifizieren (Comes et al. 2007).

Flavonoide sind als Pflanzeninhaltsstoffe vornehmlich in Tee, Früchten und den daraus produzierten Getränken entweder als Aglykone oder als Flavonoidglykoside zu finden (Watzl und Rechkemmer 2001). Speziell die präventive Wirkung auf Darmkrebs wird nicht nur in der Fachliteratur diskutiert (Theodoratou et al. 2007) sondern ist auch Thema in der allgemeinen Presse (Focus 2006).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den präventiven Einfluss von pflanzlichen Flavonoiden auf die durch das Prokarzinogen Benzo[a]pyren (BaP)-ausgelöste Effekte auf Karzinogenese-relevante Prozesse in der Kolon-Adenokarzinoma-Zelllinie Caco-2 nachzuweisen.

Die hier eingesetzten Flavonoide wurden, so ausgewählt, dass sie sich in ihrem chemischen Verhalten, wie den Redox-Eigenschaften, gut unterscheiden in ihrer Struktur aber nur wenig. Es sind dies Galangin, Kaempferol, Quercetin und Myricetin, die ein gemeinsames Flavonol-Grundgerüst besitzen und sich nur in der Anzahl der Hydroxylgruppen im B-Ring unterscheiden. Als schädigendes Agens wurde das Prokarzinogen **Benzo[a]pyren (BaP)** eingesetzt, da es häufig ebenfalls über die Nahrung, z.B. über gegrilltes Fleisch aufgenommen wird (Phillips 1999).

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit BaP und Flavonoide generell Einfluss auf die Induktion von DNA-Schäden, die Apoptose und den Zellzyklus in Kolon-Adenokarzinom-Zellen besitzen. Um die zugrundeliegenden Mechanismen einzugrenzen, wurden dann Effekte auf entsprechende relevante Signalwege analysiert, wobei immer die Einzelsubstanzen und für Interaktions-Analysen auch Kombinationen aus BaP und den verschiedenen Flavonoiden eingesetzt wurden. Im Fokus stand der AhR-Signalweg, über den BaP durch Induktion bestimmter Cytochrome P450 auch seinen eigenen Metabolismus initiiert und den Flavonoide als Agonisten oder Antagonisten beeinflussen können. Der Ah-Rezeptor wurde im Zuge dessen mit selektiven Inhibitoren antagonisiert. Schließlich sollte untersucht werden,

welche Rolle reaktive BaP-Metabolite und BaP-induzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) für die beobachteten Effekte spielen und ob Flavonoide hierauf als Radikalfänger oder über andere Mechanismen eine relevante Wirkung zeigten.

4 MATERIAL

4.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalienliste

Chemikalie	Firma	Ort
Acrylamid (40%)	Amresco	Solon, Ohio, USA
Agarose	Biozym	Oldendorf, Deutschland
Low Melting Agarose	Biozym	Oldendorf, Deutschland
Alpha-Naphthoflavon	Sigma	Steinheim, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma	Steinheim, Deutschland
Aphidicolin	Sigma	Steinheim, Deutschland
Benzo[a]pyren (BaP)	Sigma	Steinheim, Deutschland
Beta-Naphthoflavon	Sigma	Steinheim, Deutschland
Bromophenolblau	Sigma	Steinheim, Deutschland
BSA (Bovines Serum Albumin)	Serva	Heidelberg, Deutschland
Catalase	Sigma	Steinheim, Deutschland
Chloroform	Merck	Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma	Steinheim, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Armin Baack	Schwerin, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma	Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Galangin	Sigma	Steinheim, Deutschland
Glycerin	Sigma	Steinheim, Deutschland
Glycin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Isocitrat	Sigma	Steinheim, Deutschland
Isocitratdehydrogenase	Sigma	Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaempferol	Sigma	Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma	Steinheim, Deutschland
MgCl ₂ -Lösung (PCR Reagenz)	Sigma	Steinheim, Deutschland
Methoxynitroflavon	Uni Düsseldorf	Deutschland
3-Methylcholanthren	Sigma	Steinheim, Deutschland
Methylen-bis-acrylamid (Lösung)	Amresco	Solon, Ohio, USA
Myricetin	Sigma	Steinheim, Deutschland
NADP	Sigma	Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Na ₂ EDTA	Sigma	Steinheim, Deutschland
Nuclease (wasserfrei)	Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
Nocodazol	Sigma	Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (4%) Histofix	Merck	Darmstadt, Deutschland
Quercetin	Sigma	Steinheim, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma	Steinheim, Deutschland
Staurosporin	Sigma	Steinheim, Deutschland
Spermin-tetrahydrochloride	Fluka	St. Gallen, Schweiz
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Riedel-de Häen	Seelze, Deutschland
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (tris)	Merck	Darmstadt, Deutschland

Triton X-100	Sigma	Steinheim, Deutschland
Tween-20	Sigma	Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (30%)	Sigma	Steinheim, Deutschland

4.2 Zellkultur-Lösungen

Tabelle 2: Zellkultur-Lösungen

Zellkultur-Lösungen	Firma	Ort
DMEM 4,5 g/L Glucose	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
FCS (fetal calf serum)	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
Pen/Strep	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland

4.3 Antikörper und Sonden

4.3.1 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
AhR	Santa Cruz	sc-5579
AhRR	Abcam	ab43199
CYP1A1	Santa Cruz	sc101828
AKT	Cell signaling	9272S
Phospho-AKT	Cell signaling	4060S
ERK	Santa Cruz	sc-93
Phospho-ERK	Cell signaling	4370S
JNK	Cell signaling	3708S
pJNK	Santa Cruz	sc-6254
P38	Cell signaling	9212S
Phospho-p38	Cell signaling	4511S
γ H2Ax	BioLegend	613402
Phospho-pRb	Cell signaling	8516S
Bax	Santa Cruz	sc-23959
Bcl-2	Santa Cruz	sc-7382
PI3K	Cell signaling	4255S
GSK-3	Cell signaling	12456S
Nrf2	Santa Cruz	sc-13032
GSTP1	Santa Cruz	sc-66000
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2005
Goat anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2004
Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG	Dianova	
Cy3™ (Indocarbocyanin) conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit IgG	Dianova	

4.3.2 Sonden für Real-time-PCR

Tabelle 4: Verwendete Sonden für Real-Time-PCR

Gen	Sondenbezeichnung
AhR	HS00169233_m1
AhRR	HS00324967_m1
AIP	HS00610222_m1
ARNT	HS00231048_m1
CYP1A1	HS00153120_m1
CYP1B1	HS00164383_m1
Bax	HS00180269_m1
Bcl-2	HS00608023_m1
NfκB	HS00765730_m1
p73	HS01056230_1
p21	HS00355782_m1
p27	HS00153277_m1
c-jun	HS00277190_m1
JNK	HS00177083_m1
ERK	HS00385075_m1
p38	HS00176247_m1
AKT	HS00178289_m1
PTEN	HS00829813_s1
PI3K	HS00907957_m1
Nrf2	HS00975960_m1
Keap1	HS00202227_m1
GSTA1	HS00275575_m1
GSTP1	HS00943351_g1
GCS	HS00892604_m1
NQO1	HS001678547_m1
GAPDH	4352934-1107035

Alle Sonden wurden von Applied Biosystems, Foster City, USA geliefert.

4.4 Geräte

BINDER CB 53 Binder GmbH , Tuttlingen, Deutschland

Blotkammer TE Series Biotech Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, USA

Comet Elektrophorese Kammer 3427 Renner GmbH, Deutschland

Gel-Gießeinrichtung Sub-cell Model 192, BioRad, CA, USA

SE 260 Mini-vertikal Elektrophorese-Einheit GE Healthcare, München, Deutschland

Thermocycler Biometra, Göttingen, Deutschland

Nanodrop 1000 Spectrophotometer Nano Drop technologies, Wilmington, Delaware, USA

7500 Real Time PCR System Applied Biosystems, USA

ChemiLux imager 1400 Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland

Microtiter shaker MTS2 IKA, Staufen, Deutschland

Minishaker MS 2 IKA, Wilmington, USA

Tecan M200Pro Spektrophotometer, Crailsheim, Deutschland

Heraeus Biofuge Fresco Kendro, Hanau, Deutschland

Genius microbalance Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Megafuge 1.0R Kendro, Hanau, Deutschland

Thermo Bench HeraSafe Kendro, Hanau, Deutschland

Tumbling Tables WT17 Biometra, Göttingen, Deutschland

FACS-Calibur, BD Biosciences, California, USA

4.5 Software

WinCam 2.1 Cybertech, Berlin, Deutschland

GraphPad Prism 5 GraphPad Software, Inc., San Diego, CA 92130 USA

Comet Assay III Perceptive Instruments, UK

4.6 Verbrauchsmaterialien

Protan-nitrocellulose-membrane Schleicher and Schuell, Dassel, Deutschland

Zellkulturflaschen Nunc, Roskilde, Dänemark

96-Lochplatten Costar (VWR International, Bruchsal, Deutschland)

Mikroskop-Glasträger Roth, Karlsruhe, Deutschland

Lab Tek II chamber slide System 8-well glass slides, Nunc, Roskilde, Denmark

Cryoröhrchen Roth, Karlsruhe, Deutschland

Reagenz und Zentrifugenröhrchen, Pipetten, Spitzen, Schaber und Filter (0,2 µm)

Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

5 METHODENTEIL

In dieser Arbeit wurden Caco-2-Zellen (Human Colon Adenocarcinoma) als Modellsystem verwendet. Die ursprünglichen Zellen stammen von einem männlichen 72-jährigen Kaukasier. Caco-2-Zellen sind Epithelzellen und wachsen im Monolayer. Die Zelllinie wurde über CLS bezogen.

5.1 Zellkultur

5.1.1 Auftauen Caco-2-Zellen

Eingefrorene Zellen werden im Wasserbad (37 °C) innerhalb weniger Sekunden aufgetaut und die weitere Durchführung erfolgt unter sterilen Bedingungen. Die Zellen werden zum Waschen in 10 ml Wachstumsmedium überführt (DMEM 4,5 g/L Glucose, 20 % FCS, 1% Pen/Strep) und anschließend bei 800 rpm für 8 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 1 mL Medium resuspendiert. Das normale Wachstumsmedium wird mit 10 % FCS angesetzt, statt 20%. Die Zellen werden in eine T75 Kulturflasche mit 20 mL Medium ausgelegt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

5.1.2 Passagieren Caco-2-Zellen

Die Zellen werden 2-3 Mal wöchentlich passagiert. Wenn die Zellen einen konfluenten Monolayer ausgebildet haben werden sie 2x mit jeweils 5 mL 1xPBS (steril) gewaschen. Anschließend werden pro Flasche 3 mL Trypsin-EDTA zum Ablösen der Zellen zu pipettiert und für ca. 10 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Durch Klopfen lösen sich die Zellen vom Flaschenboden. Die Reaktion vom Trypsin wird mittels eines Abstopppmediums beendet, hierzu werden 10 mL Abstopppmedium (3 mL FCS + 10 mL Wachstumsmedium) pro Flasche zugegeben. Die Zellen werden dann bei 800 rpm für 8 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in ca. 1 mL Wachstumsmedium / Flasche resuspendiert. Die Auszählung der Flaschen erfolgt mittels Neubauer Zählkammer. Beim normalen Passagieren wird ein Splitverhältnis von 1/5 verwendet. Die Zellen werden entsprechend im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

PBS (10 x)

80,03 g NaCl

2,01 g KCL

14,24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,04 g KH_2PO_4

mit NaOH den pH-Wert auf 6,9 einstellen

mit H_2O auf 1 L auffüllenPBS (1x)Verdünnung 1:10 vom 10-fach PBS mit H_2O **5.2 Zytotoxizitätstest**

Um die optimale, nicht toxische Konzentration für die geplanten Versuche zu ermitteln, wurde der Neutralrotest als Zytotoxizitätstest verwendet. Dieser Test dient dazu, die durch eine Chemikalie geschädigten oder abgestorbenen Zellen zu ermitteln. Mittels nicht-ionischer Diffusion kann der Farbstoff Neutralrot (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) in die Zellen und ihre Lysosomen gelangen. Als basischer Farbstoff wird er im sauren Milieu der Lysosomen protoniert und akkumuliert hier als Kation, das nicht mehr aus den Lysosomen diffundieren kann (Babich & Borenfreund 1991). Geschädigte oder tote Zellen besitzen keine intakten Lysosomen mehr, der Farbstoff kann sich nicht einlagern und die Zelle wird nicht gefärbt. Die Zytotoxizität der getesteten Substanzen wird über eine konzentrationsabhängig verminderte Aufnahme des Farbstoffes bei einer 24 h Exposition gemessen. Der Test wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Babich & Borenfreund 1991). Zunächst werden Zellen auf einer 96-Lochplatte ausgelegt und für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Dies erlaubt den Zellen adherent einen konfluenten Monolayer auszubilden, sie befinden sich dann in einer exponentiellen Wachstumsphase. Nach den 24 h wird das Medium von den Zellen entfernt und das Inkubationsmedium (200 μL /well) mit den zu testenden Substanzen zugegeben. Es erfolgt eine 24 h Exposition mit den Substanzen bei 37°C und 5% CO_2 . Anschließend wird das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen werden mit der Neutralrotlösung (Biochrom, Berlin, Deutschland) für 3 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal vorsichtig mit 1xPBS gewaschen

und die Entfärbelösung (50% Ethanol, 1% Essigsäure, 49% dest. Wasser) wird zugegeben, um das akkumulierte Neutralrot in Lösung zu bringen. Die Platte wird für 20 min geschüttelt (600 rpm). Die Absorption der extrahierten, homogenen Lösung wird bei 540 nm (OD_{540}) im Tecan M200Pro Spektrophotometer bestimmt. Für die Auswertung wird anschließend noch eine Proteinbestimmung mittels BC-Assay (siehe 5.4) durchgeführt. Die Absorptionswerte werden dann auf den Proteingehalt der einzelnen Proben als Bezugsgröße normiert.

5.3 Proteinaufreinigung

Die im konfluenten Monolayer angewachsenen Zellen werden abtrypsiniert, gewaschen und in Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellzahl wird mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wird in 800 μ L gekühlten RIPA Puffer + PMSF gegeben (10 mL RIPA Puffer + 50 μ L PMSF), für 15 min. geschüttelt und anschließend bei 4°C für 15 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Zelltrümmer (Membran u.ä.) befinden sich im abgesetzten Pellet. Die Proteine aus dem Überstand werden in ein gekühltes Eppi übertragen und bei -20°C eingefroren und gelagert.

Die Kulturflaschen mit einem konfluenten Monolayer behandelte Zellen werden nach Ablauf der Inkubationszeit sofort auf Eis gestellt. Die Zellen werden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, die Flaschen werden anschließend schräg gestellt, so dass überschüssiger Puffer ablaufen kann. Die Zellkulturflaschen verbleiben währenddessen die gesamte Zeit auf Eis. Es werden, nach der Abnahme des zurückgebliebenen PBS, 800 μ L RIPA Puffer + PMSF zugeben. Die Zellen werden mit einem gekühlten Zellschaber abgelöst und mit PMSF-haltigen RIPA-Puffer in ein gekühltes Eppi überführt (10 mL RIPA Puffer + 50 μ L PMSF).

5.4 BC-Assay

Der BCA (Bicinchoninsäure-Test) dient zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen. Das Testprinzip beruht auf der Bindungseigenschaft zweiwertiger Kupferionen (Cu^{2+}) an Peptidbindungen von Proteinen in alkalischen Lösungen. Im ersten Schritt werden die zweiwertigen Kupferionen durch die Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan zu einwertigen Kupferionen (Cu^+) reduziert. Dieser Vorgang, auch als Biuretreaktion bekannt, läuft in einem alkalischen Milieu ab. Im zweiten Schritt erfolgt die colorimetrische Reaktion von Cu^+ mit der Bicinchoninsäure. Der

purpurne Chelatkomplex, bestehend aus zwei Molekülen Bicinchoninsäure mit einem Cu^+ -Ion, wird colorimetrisch bestimmt.

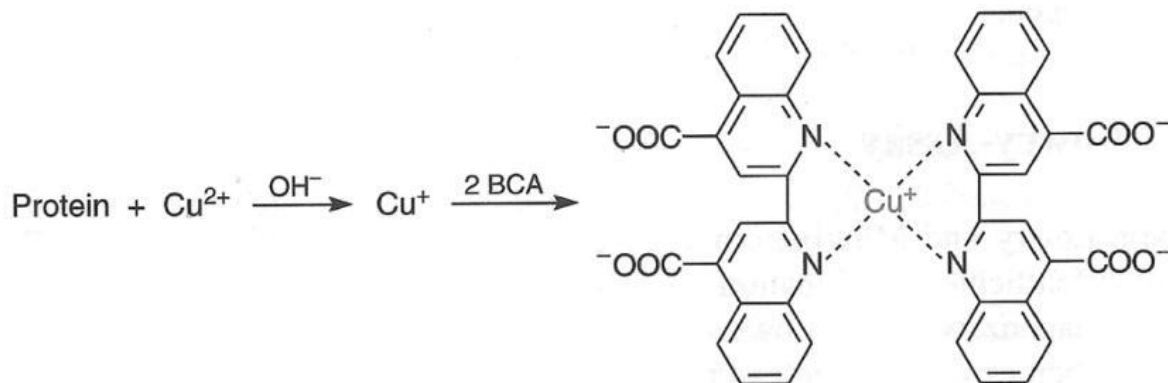


Abbildung 5: Prinzip des BC-Assays zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Friedrich Lottspeich & Haralabos Zorbas 1998)

Bei der Durchführung des BCA (Interchim, Frankreich) werden alle Proben zuvor 1/10 in destilliertem Wasser (Millipore) verdünnt. Anschließend werden 25 μL der Probe in Dreifachbestimmung auf eine 96-Lochplatte pipettiert. Zur Quantifizierung wird eine BSA (Bovine Serum Albumin) Standardreihe laut Kit (Uptima) angesetzt und in der gleichen Messung der Proben bestimmt. Pro well werden 200 μL des BC-Reagenz zugegeben und 30 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 570 nm mittels Tecan M200Pro Spektrophotometer gemessen. Anhand der BSA Standardkurve und der Blankmessung wird die Probenkonzentration anhand der Absorptionsdaten ermittelt.

Die gesamt Proteinkonzentration der Probe wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Proteinkonzentration} = (a/b) * c$$

a = Absorption (Mittelwert der Dreifachbestimmung)

b = Steigung der Standardkurve (mg)

c = Verdünnungsfaktor der Probenaufbereitung (10) (mL)

5.5 SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine Methode, in der denaturierte Proteine durch Assoziation mit negativ geladenen Dodecylsulfat-Ionen durch ein Acrylamidgel anhand eines elektrischen Feldes gezogen werden. Im Gel werden die Proteine entsprechend ihrer Größe getrennt.

5.5.1 Vorbereitung der SDS-Gele + Probenaufbereitung

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden je nach Molekulargewicht des gesuchten Proteins Trenngele mit einer Acrylamid-Konzentration von 10% oder 12,5% und jeweils einem Sammelgel mit 2,9% Acrylamid verwendet. Die Gele wurden laut der Beschreibung von Laemmli (Laemmli 1970) unter Verwendung einer Gießkammer von GE Healthcare (SE 260 Mini-Vertical Unit) hergestellt. Die genaue Zusammensetzung der für die Gele verwendeten Lösungen ist unten aufgeführt. Es werden immer 4 Gele auf einmal gegossen und anschließend in feuchtem Papier bei 4-8°C für bis zu 4 Wochen gelagert.

Der Probenpuffer wurde ebenfalls angelehnt an (Laemmli 1970) hergestellt. Zu analysierende Proteinproben werden in diesem verdünnt (Ansatz siehe unten). Im Probenpuffer befindet sich Natriumdodecylsulfat (SDS), welches als amphipathisches Detergenz verwendet wird und Proteine mit negativen Ladungen versieht. Im Probenpuffer verdünnt (1:1) werden die Proteine zur Denaturierung auf 95°C für 5 min. erhitzt. Jeweils 40 µg Probe wird in 20 µL pro Gel-Tasche aufgetragen.

Puffer und Lösungen zur Gel-Herstellung

Acrylamid A

3,5 M Acrylamid

29,2 mM Methylen-bis-acrylamid

Acrylamid B

3,5 M Acrylamid

43,5 mM Methylen-bis-acrylamid

Trenngel-Puffer

750 mM Tris-HCL, pH 8,8

Sammelgel-Puffer

250 mM Tris-HCL, pH 6,8

Ammoniumpersulfat-Lösung

0,3 M Ammoniumperoxodisulfat

SDS-Lösung

10 % SDS in H₂O

Probenpuffer (10 mL)

2 mL Glyzerin

2,52 mL Sammelgel-Puffer (pH 6,8)

380 µL H₂O

100 µL Mercaptoethanol

4 mL 10 % SDS

1 mL Bromphenolblau-Lösung

Die Trenn- und Sammelgele werden mit den oben aufgeführten Lösungen hergestellt und die Lösungen im Wasserstrahl-Vakuum entgast. Die Polymerisation wird nach Zugabe von TEMED (Tetramethylethyldiamin) durch APS-Lösung eingeleitet.

5.5.2 Molekulargewicht-Marker

Als Marker zur Ermittlung des Molekulargewichts der Proteine werden 2 µL des MagicMark™ XP Western Protein Standards (Invitrogen; cat: LC5602) sowie als zusätzlicher Marker und Laufkontrolle eine „Pre-Stained-Protein-Ladder“ von Fermentas (cat: 26616) verwendet. Die Marker wurden rechts und links flankierend zu den Proben aufgetragen.

5.5.3 Standards

Als Standard für die Identifizierung der CYP1A1 Proteinexpression in den Zielzellen wurden charakterisierte Lebermikrosomen von 3-Methylcholanthren-behandelten Ratten verwendet (Roos 2002).

5.5.4 Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde in einer SE 260 Mini Vertical Elektrophorese Einheit von GE Healthcare durchgeführt. Zur Auftrennung der Proteine wurden 240 V verwendet und 20 mA pro Gel. Nach Durchlaufen des Sammelgels kann die Stromstärke auf 40 mA/Gel hochgestellt werden. Die Zusammensetzung des

Laufpuffers für die Elektrophoresekammer ist unten aufgeführt. Die Elektrophorese wird gestoppt, wenn die Laufront den unteren Rand des Gels erreicht hat.

Laufpuffer

25 mM Tris-HCL, pH 8,3 / 190 mM Glycin / 3,5 mM SDS

5.6 Western-Blot-Analyse

Nach der SDS-PAGE werden die aufgetrennten Proteine mittels elektrischen Blottens (1 h, 400 mA) auf eine Protan-Nitrozellulose Membran (Whatman, Deutschland) übertragen. Hierfür wird die Nassblot-Kammer von TE Series Biotech und ein Tris-Glycin-Methanol Puffer (Blotpuffer siehe unten) verwendet (Towbin et al. 1979). Die Gele werden vorsichtig aus der Elektrophoresekammer und den Glasplatten entfernt, anschließend werden sie kurz im Blotpuffer gewaschen. Die Nitrozellulose-Membranen werden vorgeschnitten und ebenfalls im Blotpuffer eingelegt. Die Gele werden dann auf die Membran gelegt und beschriftet. Nach dem Blotten wird das leere Gel entsorgt und die Membran in 1xTBS + 0,1% Tween 20 (Sigma) gewaschen. Anschließend wird die Membran mittels einer 5% BSA/TBS/0,1% Tween-20-Lösung geblockt (1 h, RT), um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu unterdrücken. Sowohl der Erst-Antikörper als auch der Zweit-Antikörper werden in diesem BSA-Puffer den Herstellerangaben entsprechend verdünnt (siehe Tabelle 3). Der spezifisch an das gesuchte Protein (Antigen) bindende Erst-Antikörper wird über Nacht mit der Blotmembran inkubiert. Nach Entfernung überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1xTBS + 0,1% Tween-20 wird mit dem HRP (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelten und gegen den Erst-Antikörper gerichteten Zweit-Antikörper für 1,5 h inkubiert. Danach wird überschüssiger Zweit-Antikörper ebenfalls durch dreimaliges Waschen mit 1xTBS + 0,1% Tween-20 entfernt. Die Detektion der gesuchten Proteine erfolgt über ECL (enhanced Chemolumineszenz) (GE Healthcare, ECL Select). Das sich im ECL-Reagenz befindende Luminol wird über das Enzym HRP in seine oxidierte, chemolumineszierende Form umgesetzt (ChemiLux imager 1400 Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) (Towbin et al. 1979). Der Blot wird fotografiert und mittels WinCam 2.1 Cybertech, Berlin, Deutschland werden die einzelnen Banden quantifiziert. Zur Ladungskontrolle der Proben wird zusätzlich β -Actin (Sigma) mit einem Maus-anti- β -Actin Erst-Antikörper und einem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper

(Santa Cruz)) wie zuvor beschrieben detektiert und ausgewertet. Die Intensität der Zielbande des gesuchten Proteins wird bei der Auswertung auf die entsprechende β -Actin Bande bezogen, um eine quantitative Aussage über die Veränderungen der Expression des Zielproteins treffen zu können.

Blotpuffer

250mM Tris, pH 8,3

192 mM Glycin

0,1 % SDS

20 % (v/v) Methanol

5.7 RNA-Aufreinigung mit TRIZOL

Die im konfluenten Monolayer angewachsenen Zellen werden abtrypsiniert, gewaschen und in Wachstumsmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zelldichte mittels Neubauer Zählkammer werden ca. 2×10^6 Zellen in 1 mL TRIZOL (Quiazol von Quiagen), in ein Reaktionsgefäß, überführt. Pro Reaktionsgefäß werden 200 μ L Chloroform zugefügt und für 15 sek. geschüttelt, anschließend wird das Chloroform für 2-3 min. inkubiert. Die RNA-Proben werden für 15 Minuten bei 4°C bei 12 000 rpm zentrifugiert. Die RNA befindet sich nun in der oberen wässrigen Phase und kann vorsichtig entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Zur Fällung der RNA werden pro Probe 500 μ L Isopropanol zugegeben und für 10 min. inkubiert und ab und zu invertiert. Anschließend werden die Proben für 10 min. bei 4°C bei 12 000 rpm zentrifugiert. Die RNA liegt nun als Pellet vor, der Überstand wird abgenommen. Als nächstes wird das RNA-Pellet mit 1 mL Ethanol (75% unvergällt) gewaschen, hierzu wird die Lösung nach Ethanolzugabe für ca. 2 sek. gevortext und anschließend bei 9000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Waschvorgang wird dreimal wiederholt. Das Pellet wird an der Luft, über Kopf, getrocknet. Zuvor werden größere Ethanoltropfen ausgeschlagen und die Position des Pellets markiert. Erst wenn keine Ethanolreste mehr vorhanden sind und das Pellet farblos und durchsichtig wird, ist das Pellet soweit getrocknet, dass es in 30 μ L DEPC Wasser resuspendiert wird. Die resuspendierten Proben werden auf Eis gestellt und anschließend bei -20°C gelagert.

5.8 Bestimmung der RNA-Konzentration

Der Gesamt-RNA-Gehalt der aufgearbeiteten RNA-Proben wird mittels eines Nanodrop Spektrophotometer ND1000 bestimmt. Nach einem Nullwert-Abgleich mit 2 µL DEPC Wasser werden die RNA-Proben laut Herstellerangaben gemessen. Nur hochreine RNA (OD ratio: 260/280 = 1,9-2,0 und 260/230 = 2,0-2,2) wird für weitere Analysen verwendet.

5.9 Agarosegelelektrophorese

Zur Qualitätsüberprüfung der RNA-Proben wird eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, die die 18S- und 28S-RNA klar voneinander getrennt zeigen sollte. Eine 2%ige Agaroselösung in TBE (siehe unten) wird durch Aufkochen in der Mikrowelle hergestellt und anschließend unter stetigem Rühren auf 60°C abgekühlt. Erst nach dem Aufkochen wird das Ethidiumbromid zugegeben (Vorsicht! Mutagen!). Die Lösung solange rühren bis das Ethidiumbromid homogen verteilt ist und dann in die Gelkammer gießen. Direkt nach dem Gießen wird der Kamm für die Proben Taschen in das Gel gesteckt. Nach dem Aushärten wird der Kamm entfernt und die Taschen werden mit Pufferlösung gespült. Das Gel liegt in einer 0,5% TBE-Lösung und ist vollständig bedeckt. Die Taschen sind zur negativen Elektrode der Kammer ausgerichtet. Die Proben werden mit dem Probenpuffer (mit dem Farbmarker: Ficoll-Bromphenolblau-Lösung) verdünnt und 2 µL der verdünnten Probe werden aufgetragen. Als DNA-Marker wird ein 1 kb-Marker (Invitrogen) verwendet. Die Laufzeit des Agarosegels beträgt ca. 40- 60 min. bei 160 V. Nach dem Stoppen wird das Agarosegel auf einen UV-Transilluminator gelegt, um die Reinheit der RNA anhand der Banden zu überprüfen.

TBE-Puffer

89 mM Tris Base

89 mM Borsäure

2 mM EDTA- Na_2 mit destillierten Wasser auf 1000 mL auffüllen.

Agarose-Lösung

4 g Agarose

200 mL 1x TBE

16 µL Ethidiumbromid

5.10 Reverse-Transkription

Die Herstellung von cDNA durch reverse Transkription ist für 5 µg der aufgereinigten RNA angelegt. Die RNA-Proben werden hierfür entsprechend in DEPC Wasser auf ein Gesamtvolumen von 19,7 µL verdünnt. Für die reverse Transkription wird die aufgereinigte RNA mit zwei Einheiten DNase-I für 10 min bei 37°C verdaut. Nach der Zugabe von 5 mM EDTA, welches die RNA vor Schwermetallionen schützen soll, werden die Enzyme durch Erhitzung (10 min. bei 75°C) inaktiviert. Es werden 5 mM MgCl₂ zugefügt, welche zum Teil mit EDTA Komplexieren, aber für weitere Reaktionen noch im Überschuss vorliegen. Anschließend werden random (zufällige) Primer angehängen durch die Inkubation für 5 min bei 65°C. Anschließend werden die Proben langsam innerhalb von 10 min. auf Raumtemperatur abgekühlt. Als nächstes wird ein Mix aus MMLV-reverse Transkriptase, dNTPs und RNase Block zupipettiert, zusätzlich enthält der Mix einen RNase-Block-Ribonuklease-Inhibitor zum Schutz vor RNA-Abbau. Der Reaktionsmix wird für 37°C für eine Stunde inkubiert. Abschließend wird die Transkriptase durch Erhitzen auf 90°C für 5 min. inaktiviert. Alle verwendeten Lösungen und Chemikalien wurden von Applied Biosystems, Foster City, USA bezogen.

5.11 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde mittels TaqMan®-apparatus7500 (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Alle Lösungen, Proben und Verbrauchsmaterial wurden von Applied Biosystems, Foster City, CA 94404, USA bezogen (TaqMan® Universal Master Mix, No. UNG (4364343). Die verwendeten spezifischen Sonden sind im Teil Resultate zu finden. Das Prinzip der Real-Time-PCR basiert auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR (Polymerase Kettenreaktion), Denaturierung, Primer-hybridisierung und Elongation, d.h. spezifische DNA-Sequenzen (Nukleinsäuren) sollen selektiv amplifiziert werden. Bei der Real-Time-PCR besteht der wesentliche Vorteil gegenüber der „normalen“ PCR, dass die gebildete DNA quantifiziert werden können. Die Quantifizierung erfolgt über eine Sonde, die an einem Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff enthält (FAM) und an dem anderen Ende einen Quencher. Bei intakten TaqMan-Sonden wird die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors durch einen Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) unterdrückt. Die eingesetzte markierte Sonde bindet spezifisch an die Template-DNA zwischen den jeweiligen Primern. Die Taq-Polymerase verlängert die Primer. Wenn

die Taq-Polymerase während des PCR-Zyklus auf die hybridisierte Sonde trifft, baut diese aufgrund ihrer 5'-3' Exonukleaseaktivität und das 5'-Ende der Sonde ab, wodurch sich Quencher und Fluorophor voneinander entfernen. Die Fluoreszenz des Reporters kann dadurch nicht mehr vom Quencher unterdrückt werden, folglich wird eine gesteigerte Reporter-Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenz nimmt exponentiell mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die semi-quantitative Bestimmung des Transkriptspiegels erfolgt über die Normierung auf die Expression eines Referenz- oder Haushaltsgens (ΔC_t) (Saiki et al. 1985). Zusätzlich wurde ein Bezug zur unbehandelten Probe hergestellt, hierfür wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet.

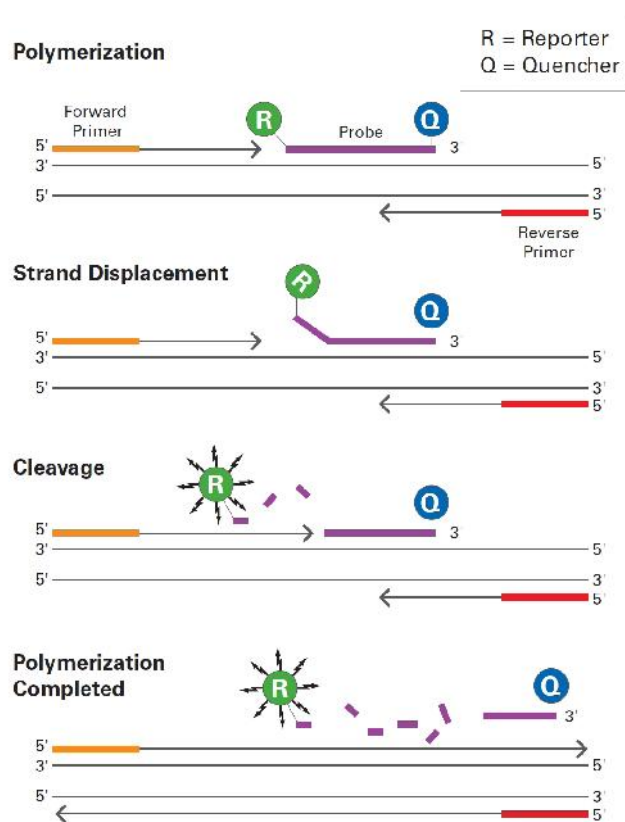


Abbildung 6: Funktionsprinzip der TaqMan® Sonden

Das Funktionsprinzip der TaqMan® Sonden beruht auf der 5'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase unter Verwendung eines Fluorophors und eines Quenchers. **Quelle:** www.lifetechnologies.com

5.12 Comet-Assay

Der Comet-Assay ermöglicht eine Einzel-Zell-Elektrophorese und stellt eine Methode zur Detektion von DNA-Schäden in einzelnen Zellen dar (Singh et al. 1988, Klaude et al. 1996). Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern durch ein Agarosegel entsprechend dem angelegten elektrischen Feld. Der Assay wurde unter marginalen

Veränderungen beim Zählen der Zellen und der Dauer der Elektrophorese laut Singh et al (1988) durchgeführt. Für die Elektrophorese vorgesehene Objektträger wurden zwei Mal mit Agarosegel beschichtet, um eine homogene Beschichtung der Oberfläche zu erzielen. Zellen (Caco-2) wurden entsprechend des Versuches mit BaP und Flavonoiden inkubiert und durch Trypsinierung aufgearbeitet. Anschließend wurden die Zellen mittels Neubauer-Zahlkammer ausgezählt und jeweils 1×10^6 Zellen wurden in Low-Melting-Agarose verdünnt. Zwei Tropfen dieser Lösung wurden vorsichtig auf den beschichteten Objektträger aufgetragen und mit einem Glasplättchen vorsichtig abgedeckt, so dass sich die Zellsuspension gleichmäßig verteilt und geschützt ist. Nach dem Eindeckeln werden die Zellen in einem Lysepuffer mit einer hohen Salzkonzentration ($\text{pH} > 13$) für 2 h lysiert und anschließend die Elektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente in einer Comet Elektrophorese-Kammer (Renner GmbH; 3427) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 25 V, maximal 300 mA, 4-8°C, 45 min. Durch das Anlegen des elektrischen Feldes erfolgt eine Migration der DNA-Fragmente aus der Zelle, Durch die Färbung mit Ethidiumbromid erscheinen diese Fragmente als „Kometen“. Die Größe und die Form des Kometen, wie auch die Verteilung der DNA innerhalb des Kometen, korrelieren mit dem Maß der DNA-Schädigung der Zellen (Fairbairn et al. 1995). Die Interpretation des durchgeführten Comet-Assays wurde mittel der Comet-Assay III Software von Perceptive Instruments (UK) ausgeführt. Zur Auswertung der DNA-Schädigung wurde das sogenannte „Olive-Tail-Moment“ berechnet, dieses setzt sich aus der Schweiflänge des Kometen und dem Anteil der Total-DNA im Schweif zusammen (Olive et al. 1990).

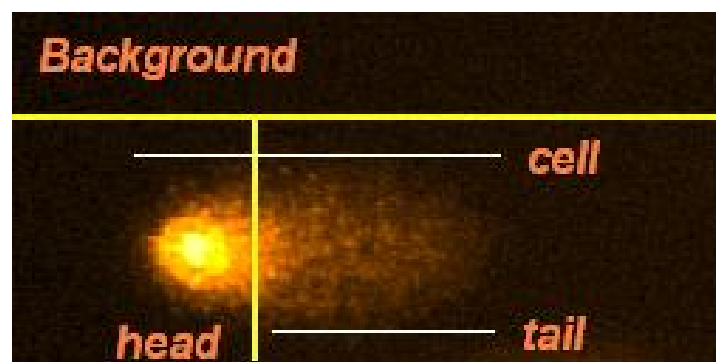


Abbildung 7: Darstellung einer 24 h mit BaP-inkubierten Zelle nach der Durchführung des Comet-Assays.

Das „Tail-Moment“ ist als Produkt der Schweiflänge und der Fraktion der Total-DNA im Schweif definiert.

Die Schweiflänge wird vom Mittelpunkt des Kopfes bis zur Mitte des Schweifes gemessen.

5.13 Herstellung von DEPC-Wasser

Das DEPC (Diethylpyrocarbonat) ist ein RNase zerstörendes Agens, welches beim Umgang mit RNA verwendet wird. Zur Herstellung des DEPC-Wassers wird Millipore-Wasser mit 0,1% (v/v) DEPC inkubiert und über Nacht gerührt. Anschließend wird das Pyrocarbonat durch das Autoklavieren der Lösung zerstört, dies wird zwei Mal für 15 min. durchgeführt (Summers 1970).

5.14 FACS (Fluorescence activated cell sorting)

Die FACS-Methode ist eine Durchflusszytometrie, welche die Analyse von Zellen erlaubt, die in einem hohen Tempo einzeln an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl (Laser) vorbei fließen (Fulwyler 1965). Generell können mit Hilfe der Durchflusszytometrie Zellen charakterisiert und Zellpopulationen isoliert werden. Für die FACS-Analyse wurden unbehandelte sowie für 24 h mit BaP, Flavonoiden, Inhibitoren (MNF, α -Naphthoflavon) sowie einem AhR-Aktivator (β -Naphthoflavon) behandelte Caco-2-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden abtrypsiniert und 1×10^6 Zellen in 1 mL Medium + 20% FCS verdünnt. Die Zell-Suspension wurde anschließend in 2 mL PBS aufgenommen und bei 4°C für 7 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen im Lysepuffer LB01 (siehe unten) für 30 min im Dunkeln lysiert. Der Lysepuffer enthält bereits Propidiumiodid (Sigma) (20 μ L/Probe einer 1,5 mM PI Lösung) und 20 μ L/Probe RNase (1 mg/mL) (Sigma). Die RNase wurde zuvor 15 min bei 90 °C erhitzt, um DNasen zu inaktivieren.

Das Propidiumiodid interkaliert in die DNA der Zellen, d.h. es erfolgt eine Einlagerung zwischen den Basen. Hierüber lässt sich die Menge an DNA über die FACS-Analyse ermitteln und somit die Zuordnung von Zellen zu Zellzyklusphasen oder Apoptose vornehmen.

Die FACS-Messung wurde mittels FACS Calibur (BD, Becton-Dickinson) durchgeführt. Hierbei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbei geführt. Die Anregung durch den Laser führt zu einer Fluoreszenzemission, welche mittels Detektoren aufgenommen wird. Die Auswertung erfolgte mittels der zugehörigen Software CellQuest.

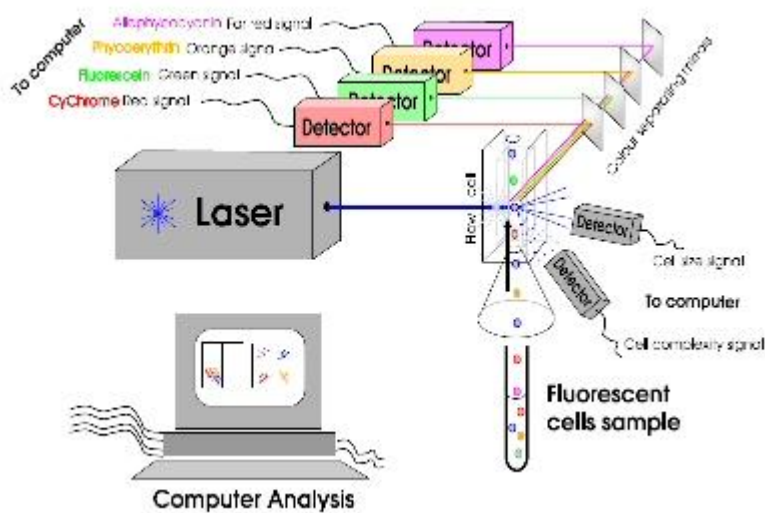


Abbildung 8: Graphische Darstellung einer FACS Analyse
(Quelle: www.medizin.uni-greifswald.de)

Lysepuffer FACS (LB01)

15 mM Tris
2 mM Na₂EDTA
0,5 mM Spermin-tetrahydrochlorid
80 mM KCL
20 mM NaCl
0,1 % (v/v) Triton-X-100
15 mM 2-Mercaptoethanol

Es wurden 100 mL LB01 angesetzt. Vor Zugabe von 2-Mercaptoethanol muss zunächst der pH mit 1 N HCL auf einen pH von 7,5 eingestellt werden. Anschließend wird die Lösung über einen 0,22 µm Filter filtriert und dann bei 4°C gelagert.

5.15 Bestimmung der Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität (EROD)

Die Aktivitätsbestimmung mit Lebermikrosomen wurde im 96-Lochplatten-Format mittels Tecan M200 Pro Spektrophotometer durchgeführt. Es wurden maximal zwei Reihen (16 Löcher) pro Experiment verwendet, damit das Auslesen der Fluoreszenz in einer angemessenen Zeitspanne zur Ermittlung der Reaktionskinetik erfolgen kann. Nur jeweils 1 µL einer geeigneten Flavonoidverdünnung (in DMSO) wurde in die Löcher pipettiert, dies ergibt nach Zugabe von 200µL Reaktionsgemisch Flavonoid-Endkonzentrationen zwischen 0,05 nM und 157 µM. Dieses Gemisch besteht aus 100 mM Tris-HCL (pH 7,8), 3 mM MgCl₂, 2,7 mM Isocitrat, 0,3 U/mL

Isocitrat-Dehydrogenase, 0,2 mM NADP, 100 U/mL Katalase. 53 µg/mL BSA und 2,3 µM Ethoxyresorufin als Substrat. Zum Schluss werden Lebermikrosomen von 3-Methylcholanthren behandelten Ratten in einer Proteinendkonzentration von 10 µg/mL zugegeben. Nach vorsichtiger Durchmischung und einer Vorinkubation von 5 min bei 37 °C werden 200 µL dieses Reaktionsgemisches auf die vorbereitete Mikrotiterplatte, die bereits die verdünnten Flavonoide in maximal 14 verschiedenen Konzentrationen enthält, pipettiert. Als Lösemittelkontrolle DMSO verwendet.

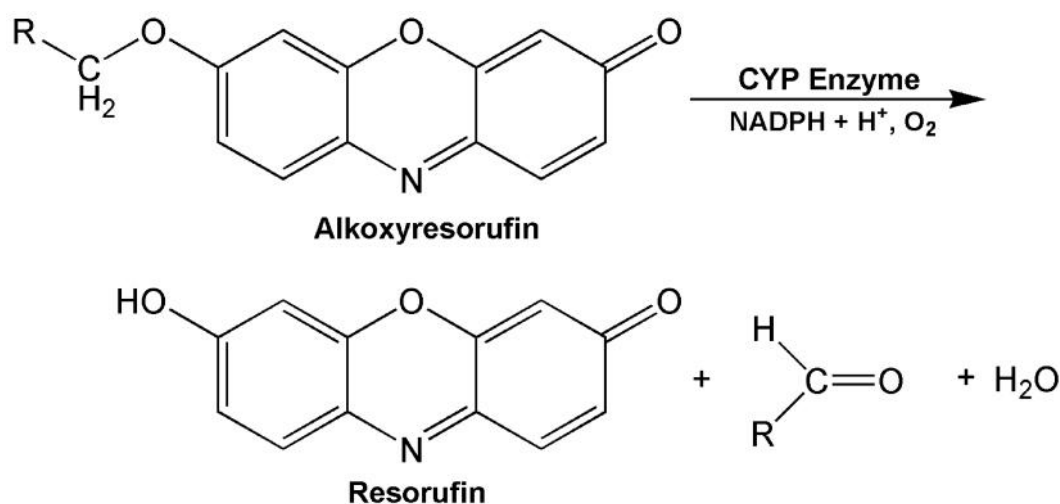


Abbildung 9: Prinzip der Ethoxyresorufin-O-deethylase katalysierten Reaktion.

Folgende Konditionen für die Fluoreszenz-Messung wurden verwendet: Exzitation bei $\lambda = 530$ nm, Emmission bei $\lambda = 585$ nm, 20 Messzyklen mit einem zeitlichen Intervall von 1 Minute inklusive 45 Sekunden schütteln. Zur Aktivitätskalkulation wurde eine Eichgerade mit Resorufin aufgenommen. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von DMSO-gelöstem Resorufin im oben beschriebenen Reaktionsgemisch (ohne Ethoxyresorufin und Mikrosomen) erstellt. Die Kinetik-Daten wurden mittels EXCEL und GraphPad Prism Software ausgewertet.

Zur Ermittlung der Inhibition und Aktivierung der EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen durch die Flavonoide wurde ebenfalls eine Kinetik erstellt. Caco-2-Zellen wurden auf eine 96 wp ausgelegt (5×10^4). Die für die Inhibitionsversuche vorgesehenen Zellen wurden zur Induktion von CYP1A1 zunächst 24 h mit 3 µM BaP bei 37 °C exponiert, um ausreichend EROD-Aktivität zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit 1x PBS gewaschen und für weitere 1,5 h mit Medium + FCS inkubiert. Die

Inkubation mit BaP-freiem Medium soll gewährleisten, dass das BaP vollständig aus den Zellen geschwemmt wird um keine Wechselwirkungen mit den Flavonoiden zu erhalten damit ausschließlich die Flavonoide auf die EROD wirken. Das Medium wird abgesaugt und die Flavonoid-Inkubationsmedien werden zugegeben. Die Inkubation der Flavonoide erfolgt für weitere 1,5 h bei 37 °C. Anschließend wird das Flavonoid-Inkubationsmedium abgesaugt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Den Zellen wird nun das EROD-Substrat Ethoxyresorufin (1 µM) zugefügt und eine Eichgerade mit Resorufin erstellt. Die Exzitation wird auf $\lambda = 530$ nm eingestellt und die Emission bei $\lambda = 585$ nm mittels Tecan M200 Pro Spektrophotometer gemessen. Zur Kontrolle wird abschließend ein BC-Assay durchgeführt und die EROD-Aktivität auf die Proteinkonzentration bezogen.

Für die Untersuchungen zur Induktion der EROD-Aktivität werden auf eine 96-Lochplatte aufgebrachte Zellen mit 3 µM, BaP, Flavonoiden in 10 µM Konzentrationen, sowie BaP-Flavonoid-Kombinationen für 24 h inkubiert. Anschließend wird das Inkubationsmedium entfernt und drei Mal mit PBS gewaschen. Wie beim Inhibitionsversuch wird die Reaktion nun durch das EROD-Substrat Ethoxyresorufin (1 µM) gestartet und die Messung wie zuvor beschrieben vorgenommen.

5.16 Caspase-3-Aktivitätsassay

Caspasen sind eine Gruppe von Enzymen, die bei der Kontrolle und der Steuerung der Apoptose eine entscheidene Rolle spielen. Sie sind **Cystein-Proteasen**, die ihr Substrat nach einem spezifischen **Aspartatrest** schneiden. Für die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurde das Caspase-3/CPP32 Fluorometric Assay Kit von BioVision (cat: K105-200) verwendet. Die Aktivität der Caspase-3 wird über die Detektion des aus dem Tetrapeptid-Derivat DEVD-AFC abgespaltenen fluoreszierenden Produkts AFC ermittelt. DEVD steht für die Sequenz des Tetrapeptids im Einbuchstabencode der Aminosäuren Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure und AFC für 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin. Das DEVD-Motiv ist die Erkennungssequenz für die Caspase-3 innerhalb der Poly-ADP-Ribose-Polymerase I (PARP-1), die während der Apoptose durch Caspase-3 geschnitten wird. Das durch die Caspase-Aktivität aus dem Substrat abgespaltene AFC emittiert nach Anregung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 400$ nm eine gelb-grüne Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{max}} = 505$ nm.

Die Caco-2-Zellen werden mit Apoptose induzierenden Agenzien und mit den zu untersuchenden Substanzen (BaP, Flavonoide) für 24 h exponiert, anschließend abtrypsinisiert und ausgezählt. Exponierte und unbehandelte Kontroll-Zellen werden in mit 5×10^6 Zellen/Well in einer 96-Lochplatte ausgelegt, die zuvor mit 50 μ L gekühltem Zelllysepuffer/Well bestückt wurde. Nach Durchmischung mit dem Lyse-Puffer werden die Zellen anschließend auf Eis für 10 min inkubiert. Nach der Lyse werden 50 μ L DDT-haltigem Reaktionspuffer zu jeder Probe hinzugefügt. Das DDT wird dem Reaktionspuffer erst kurz vor der Messung in einer Konzentration von 10 mM zugefügt. Zum Start der Caspase-3-Reaktion werden 5 μ L DEVD-AFC Substrat/Well zugegeben und für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die fluorimetrische Bestimmung der Substratumsetzung wird mittels Tecan M200Pro Spektrophotometer gemessen, die Anregung erfolgt bei 400 nm und die Emmission bei 505 nm. Die Caspase-3-Aktivität wird im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt (Fernandes-Alnemri et al. 1995, Gurtu et al. 1997, Schmidt N 2003).

5.17 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz (IF) ist eine gängige Analysemethode zur Detektion von Antigenen, wie Proteinen. Die Detektion erfolgt über die Bindung spezifischer Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) markiert sind. Fluorochrome sind in der Lage Licht zu absorbieren und daraufhin Licht mit niedrigerer Energie und damit höherer Wellenlänge zu emittieren. Dieser Prozess wird als Fluoreszenz bezeichnet.

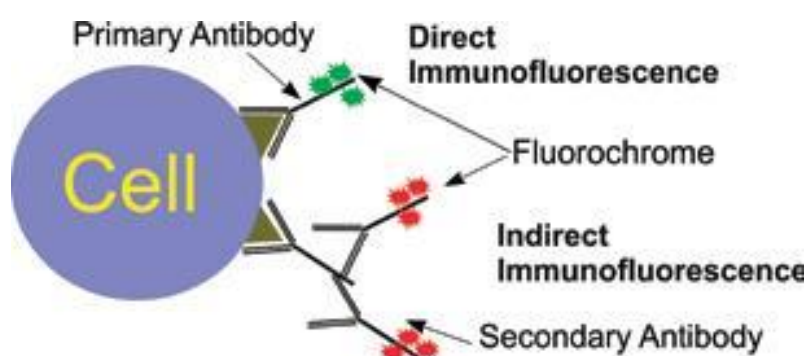


Abbildung 10: Schematische Darstellung der direkten und indirekten Immunfluoreszenz (Quelle: www.dako.com)

Beim Prinzip der Immunfluoreszenz unterscheidet man zwischen der direkten und der indirekten Immunfluoreszenz. Bei der direkten Immunfluoreszenz werden die

Antigene mit nur einem Fluorochrom-markierten Antikörper nachgewiesen. Diese Methode ist schnell und einfach. Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird das Antigen auch an einen spezifischen Antikörper gebunden, dieser ist jedoch nicht markiert. Erst ein gegen den Erst-Antikörper gerichteter zweiter Antikörper, ist Fluorochrom-markiert und macht hierüber das Antigen sichtbar. Die letztgenannte Methode erlaubt einen sensitiveren Nachweis und eine höhere Flexibilität bei der Wahl der Antikörper. In dieser Arbeit wurde für den Nachweis der Antigene die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

Für die Durchführung werden die Zellen (Caco-2) in 24-Lochplatten auf Deckgläsern (18 mm) ausgelegt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h werden die Zellen mit BaP, Flavonoiden, MNF (AhR Inhibitor), Beta-Naphthoflavon (AhR-Agonist und CYP1A1-Induktor), Alpha-Naphthoflavon (CYP1A1-Inhibitor) und Kombinationen für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ exponiert. Das Inkubationsmedium wird abgesaugt und die Zellen werden mit 4 % Paraformaldehyd (Histofix) fixiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

Die Permeabilisierung der Zellen geschieht durch die Zugabe von PBS + 0,1% Triton X-100 für 10 min bei RT. Danach erfolgt ein weiterer Waschschrift. Je nach Nachweis werden die spezifischen Antikörper zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wird der Fluorochrom-markierte 2. Antikörper zugegeben und zusammen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für 1,5 h inkubiert. DAPI dient dem Nachweis der Zellkerne und lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an. DAPI fluoresziert bei Anregung mit ultravioletter Licht im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe.

Als 2. Antikörper wurden je nach 1. Antikörper Cy³ (goat anti-mouse) oder Alexa fluor 488 (goat anti-rabbit) verwendet. Nach den Färbungen werden die Zellen nochmals mit PBS und abschließend mit H₂O gewaschen. Die Deckgläser werden aus der 24-Lochplatte entnommen und mittels FluoPreserveTM (ein Zellanheftungsreagenz von Calbiochem) auf einem Objektträger mit den Zellen nach unten gerichtet fixiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop.

5.18 Bestimmung der Radikalfänger-Eigenschaften von Flavonoiden mit Hilfe von 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Zur Bestimmung der DPPH-Radikalfänger-Eigenschaften der Flavonoide wurden Kinetikmessungen durchgeführt. Diese Kinetiken der DPPH-Reduzierung durch die

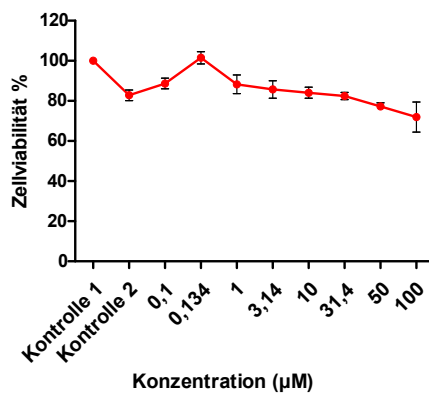
Flavonoide werden spektrophotometrisch in einer 96-Lochplatte mittels TECAN infinite M200 PRO Plattenlesegerät gemessen. Es wurden maximal 8 Proben zur gleichen Zeit gemessen, so dass Kinetikmessungen mit Messintervallen von 1 min ermöglicht wurden. Für das DPPH wurde eine Stocklösung in Methanol angesetzt und ihre exakte Konzentration photometrisch mittels des Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{515} = 1,16 \cdot 10^4 \text{ mol/L}$ bestimmt (Sendra et al. 2007). Für die Messungen wurde die DPPH-Stocklösung mit Methanol zu einer finalen DPPH-Konzentration von 35 μM in den Proben (150 μL in einer Gesamtmenge von 200 μL) verdünnt. Flavonoide und der Radikalfänger Trolox wurden in folgenden Konzentrationen in DMSO gelöst: 0.1 mM, 0.314 mM, 1 mM, 3.14 mM, 10 mM and 31,4 mM. Als Positivkontrolle wurde in allen Experimenten Trolox in einer Endkonzentration von 200 μM eingesetzt (Stammlösung: 20 mM in DMSO). Die Löcher einer 96-Lochplatte werden mit je 2 μL DMSO, 20 mM Trolox-Lösung und der sechs verschiedenen Flavonoidverdünnungen bestückt. Anschließend wurden 48 μL Methanol und 150 μL DPPH-Lösung schnellstmöglich zugegeben und sofort eine Messung per Plattenlesegerät gestartet. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 517 \text{ nm}$ in 1 min. Zeitintervallen über eine Periode von 30 min pro Probe gemessen. Jede Probe wurde dabei pro Zyklus 2 Sek. geschüttelt. Nach Beendigung der Kinetikmessung wurden für jede Probe Spektren im Wellenlängenbereich zwischen 300 nm and 700 nm aufgenommen. Sowohl die Kinetikdaten als auch die Daten aus den Spektren wurden mittels Leerwert (2 μL DMSO + 198 μL Methanol) korrigiert und mittels GraphPad Prism aufgetragen.

6 ERGEBNISSE

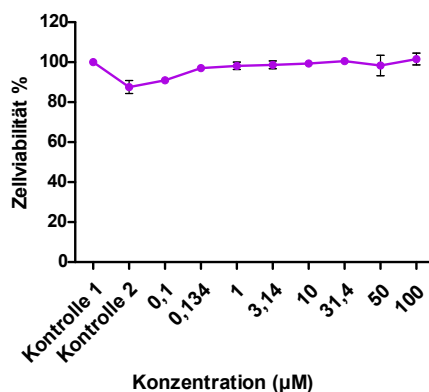
6.1 Bestimmung der experimentell einsetzbaren Konzentrationen von BaP und Flavonoiden in Caco-2-Zellen

6.1.1 Zytotoxizität von BaP und Flavonoiden

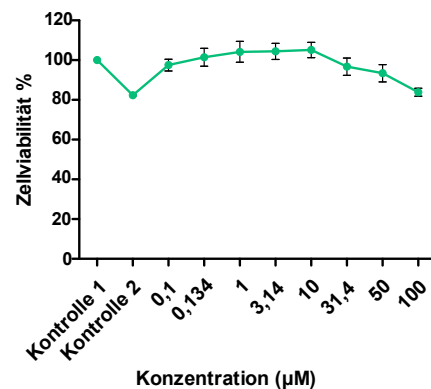
Für den Zytotoxizitätstest wurden Caco-2-Zellen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen in einer 96 wp ausgelegt und 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Konzentrationsreihen der Flavonoide $n = 3$ (Galangin, Kaempferol, Myricetin und Quercetin) und BaP für 24 h exponiert.



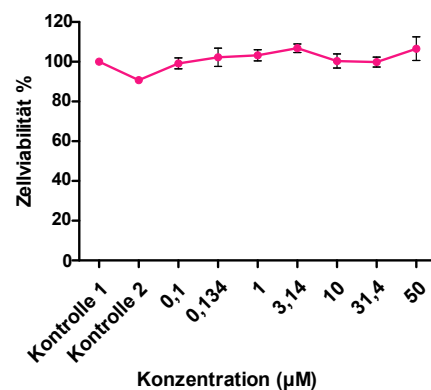
a) BaP



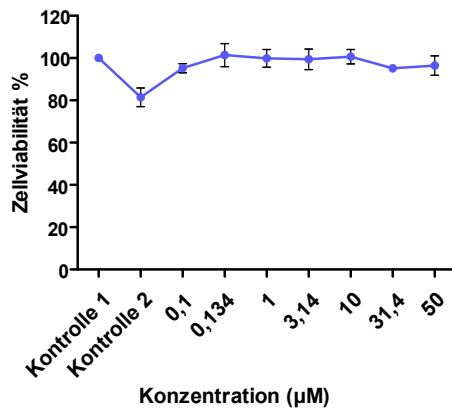
c) Quercetin



b) Galangin



d) Myricetin



e) Kaempferol

Abbildung 11: Nachweis der prozentualen Caco-2-Zellviabilität bei verschiedenen Flavonoid- und BaP-Konzentrationen mittels Zytotoxtests

(a-e). Die Zellen wurden 24 h mit den entsprechenden Flavonoid- und BaP-Konzentrationen behandelt. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen (Kontrolle 1) sowie mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) behandelte Zellen (Kontrolle 2) mitgeführt.

Beim Zytotoxizitätstest (siehe Abbildung 11) zeigten die Flavonoide Quercetin, Kaempferol und Myricetin keinerlei Veränderungen in der Zellviabilität der Caco-2-Zellen trotz steigender Konzentrationen. Galangin hingegen zeigt ein Absinken der Viabilität ab ca. 31,4 µM. Benzo[a]pyren (BaP) zeigt bereits bei niedrigen Konzentrationen (1 µM) einen Effekt auf die Zellviabilität. Ab einer Konzentration von 31,4 µM BaP sinkt die Viabilität auf unter 80 %. Für die weiteren Versuche wurde für alle Flavonoide eine Konzentration von 10 µM festgelegt. Bei dieser Konzentration ist bei allen Flavonoiden über 80 % Zellviabilität vorhanden. Für BaP wurde eine experimentelle Konzentration von 3 µM bei entsprechender Viabilität festgelegt

6.2 BaP- und Flavonoid-medierte Effekte in Caco-2- Zellen

Effekte von BaP und von Flavonoiden auf toxikologisch und karzinogenetisch relevante Prozesse in Caco-2-Zellen nämlich Auslösung von DNA-Schäden (6.2.1), Induktion der Apoptose (6.2.2) sowie Beeinflussung des Zellzyklus (6.2.3) und damit im Zusammenhang stehende Signalwege wurden untersucht (6.2.4, 6.2.5 & 6.2.6). Hierzu wurden sowohl Komponenten als auch die Expression der Zielgene dieser Signalwege mittels Real-Time-PCR und Western-Blotanalysen quantifiziert. Folgende Signalwege wurden berücksichtigt: AhR Signalweg, welcher durch die Ligandenbindung von BaP und Flavonoiden aktiviert werden kann, sowie die ERK-, JNK-, p38-, AKT- und Nrf2-Signalwege, die mit dem AhR sowie untereinander in Verbindung stehen.

6.2.1 Nachweis von BaP- und Flavonoid-medierten DNA-Schäden in Caco-2-Zellen

Die Ausbildung von DNA-Schäden wurde zum einen über entstehende Strangbrüche mittels Comet-Assay (Abbildung 12 & Abbildung 13) sowie über die induzierte Phosphorylierung der Histon-Isoform H2Ax mittels Western-Blot (Abbildung 15) und Immunfluoreszenz (Abbildung 14) analysiert. Hierzu wurden Caco-2-Zellen mit 3 μM und 10 μM BaP sowie jeweils 10 μM der Flavonoide Galangin, Quercetin, Myricetin und Kaempferol für 24 h inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte sowie zur Lösungsmittel-Kontrolle mit 0,1% DMSO behandelte Zellen.

Nachweis von BaP- oder Flavonoid-induzierten DNA-Strangbrüchen in Caco-2-Zellen

Mit beiden eingesetzten BaP-Konzentrationen zeigt sich eine signifikante Ausbildung von DNA-Strangbrüchen (10 μM BaP $p = 0,028$ und 3 μM BaP $p = 0,031$). Bei der Konzentration von 3 μM BaP kann eine Strangbruch-Steigerung von 300 % gegenüber der Lösemittelkontrolle erreicht werden. Die Flavonoide selbst bewirken in der eingesetzten Konzentration von 10 μM offenbar keine Ausbildung von DNA-Strangbrüchen (Abbildung 12 & Abbildung 13).

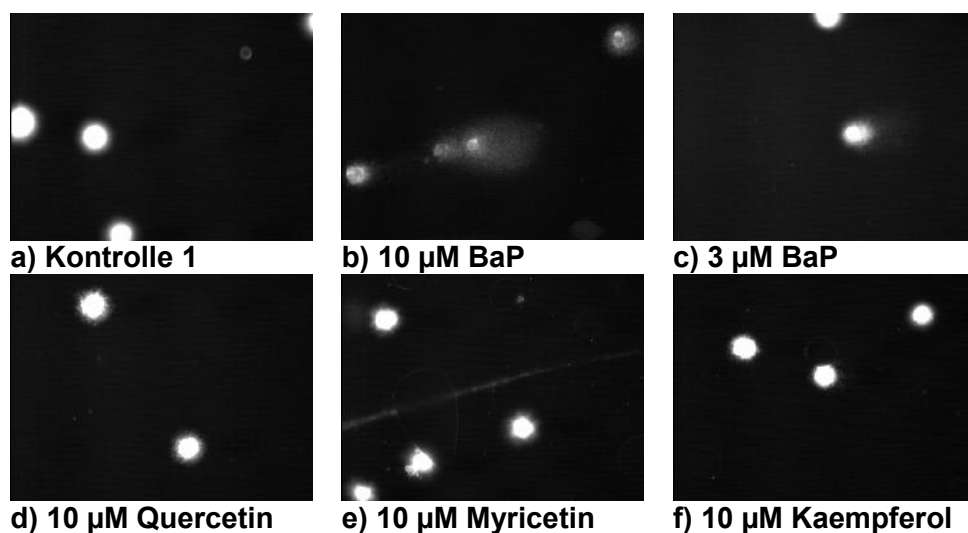


Abbildung 12: Nachweis von Effekten der Flavonoid- und BaP-induzierten DNA-Schäden in Caco-2-Zellen mittels COMET-Assay. Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μM BaP und je 10 μM Flavonoid exponiert bzw. ko-inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen (Kontrolle1) verwendet.

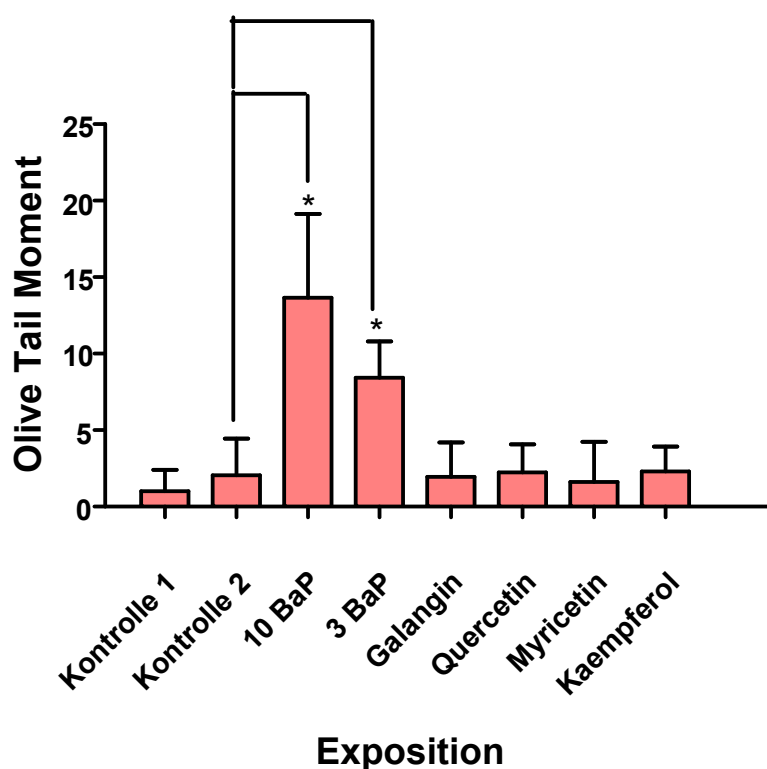


Abbildung 13: Quantifizierung der im Comet-Assay nachgewiesenen DNA-Strangbrüche in Caco-2-Zellen durch BaP oder Flavonoide. Beschreibung der Durchführung siehe Abbildung 12. (* = $p < 0,05$)

Nachweis von DNA-Schäden über die Induktion des γ H2Ax in Caco-2-Zellen

Die Induktion des γ H2Ax wurde mit zwei verschiedenen Methoden nachgewiesen, Immunfluoreszenz und Western-Blot. In Abbildung 14 zeigt BaP gegenüber unbehandelten Zellen eine sehr deutliche Induktion des γ H2Ax, die sich in einer großflächigen Anfärbung der Caco-2-Nuklei äußert. Allerdings bewirkt auch schon das Lösungsmittel DMSO allein einen Anstieg von γ H2Ax, wobei die Verteilung innerhalb der Zellkerne sich in Form einzelner Spots zeigt und die Kernrandbereiche nicht betroffen sind. Auch 10 μ M Quercetin erhöht γ H2Ax. Hier ist die Fluoreszenzverteilung ähnlich beim BaP, das Signal allerdings wesentlich geringer.

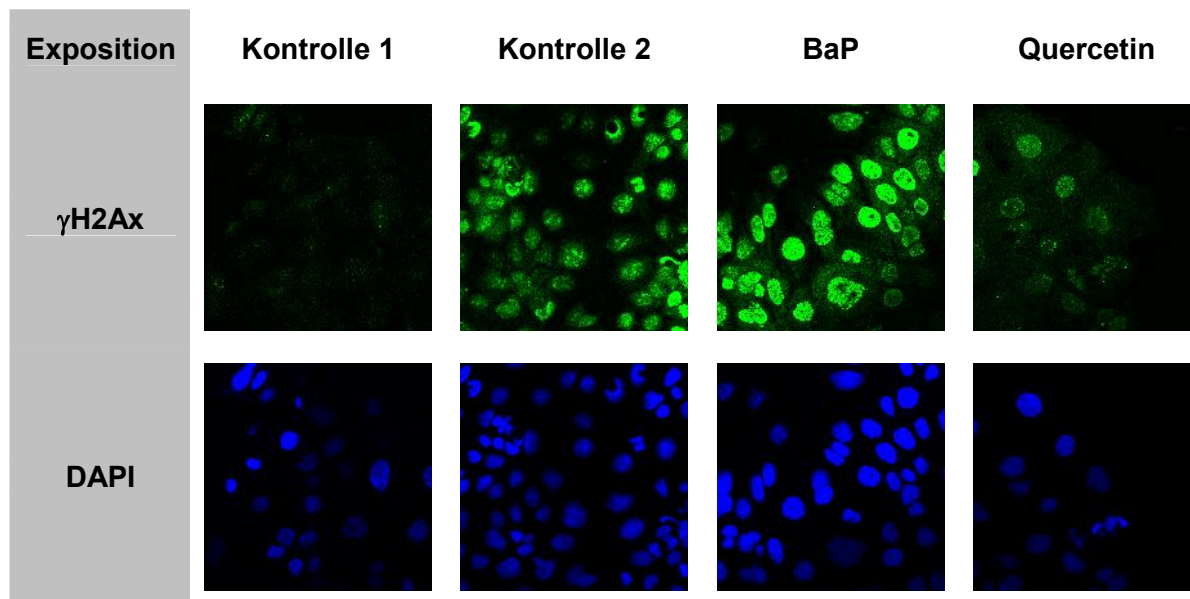
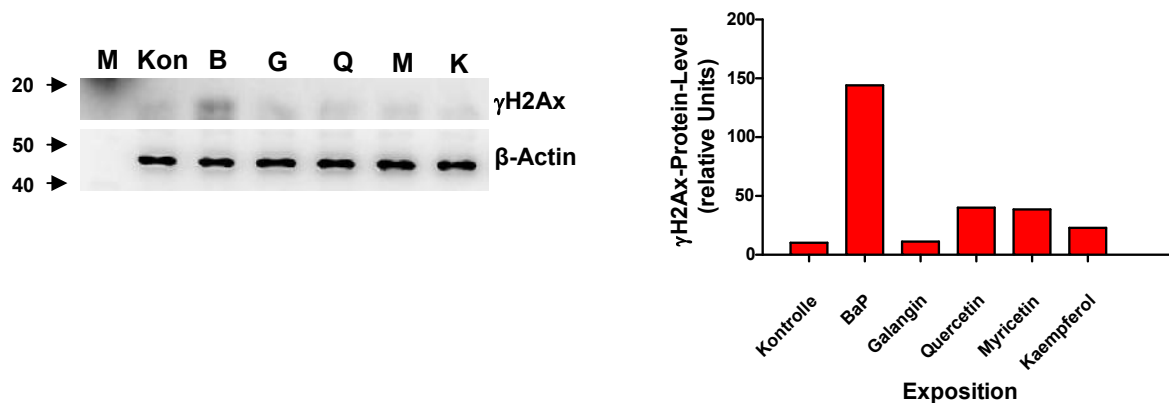


Abbildung 14: Nachweis der Induktion des Proteins γ H2Ax mittels Immunfluoreszenz. γ H2Ax wurde mit einem spezifischen *Erstantikörper* und einem AlexaFluor488-markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht, die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μ M BaP und 10 μ M des Flavonoids Quercetin inkubiert. Unbehandelte Zellen wurden als weitere Kontrolle verwendet (1).

Nachweis der γ H2Ax-Induktion durch BaP oder Flavonoide in Caco-2-Zellen

Die Induktion des DNA-Strangbruchmarkers γ H2Ax wird signifikant durch BaP erhöht (siehe Abbildung 15). Die Flavonoide Quercetin und Myricetin steigern gegebenenfalls leicht die Phosphorylierung von γ H2Ax, allerdings zeigt auch DMSO bereits einen Anstieg der H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen. Dieser DMSO Effekt wurde auch in der Immunfluoreszenz sichtbar (siehe Abbildung 14).



a) γ H2Ax Blot

b) γ H2Ax Quantifizierung

Abbildung 15: Nachweis der Induktion des γ H2Ax durch BaP oder Flavonoide in Caco-2-Zellen.

a) repräsentativer Western-Blot (n = 3) (M: Proteingrößenmarker). b) Quantifizierung der γ H2Ax Blot-Banden normiert auf β -Actin. Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M je Flavonoid exponiert.

6.2.2 Einfluss von BaP auf die Regulation der Apoptose in Caco-2-Zellen

Effekte von BaP und den Flavonoiden auf die Apoptose wurden mit Hilfe von FACS-Analysen (Abbildung 16) sowie anhand der Expression der Apoptose-relevanten Proteine Bax und Bcl-2 sowie NF κ B und p73 mittels Real-Time-PCR (Abbildung 17) und Western-Blots (Abbildung 18) untersucht. Zusätzlich wurde die Caspase-3-Aktivität bestimmt. Hierzu wurden die Caco-2-Zellen für jeden Versuch 24 h mit 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid exponiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte sowie mit 0,1% DMSO behandelte Zellen. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Einfluss von BaP und Flavonoiden auf die Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen

Wie in Abbildung 16 deutlich wird, steigert BaP signifikant Steigerung die Apoptose um das 400-fache (p = 0,002) gegenüber der Kontrolle in Caco-2-Zellen. Sie ist mit der durch Staurosporin-induzierten Apoptose vergleichbar. Staurosporin wird seit langem als Initiator der Apoptose in verschiedenen Zelltypen verwendet, diese Initiation kann sowohl Caspase-abhängig als auch –unabhängig sein (Zhang et al. 2004). Die Flavonoide selbst haben offenbar keinen oder einen gegebenenfalls marginalen Einfluss auf die Induktion der Apoptose.

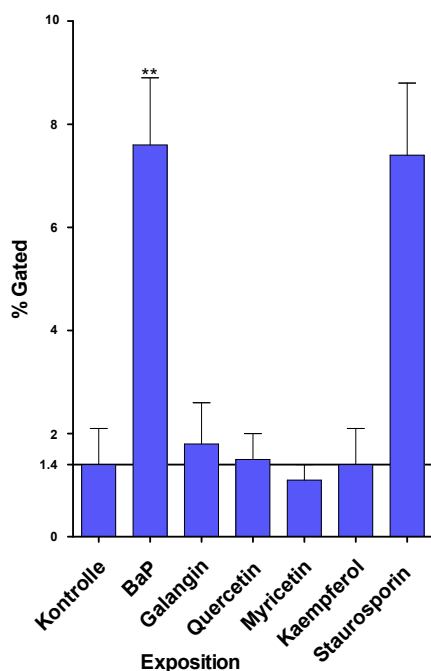


Abbildung 16: FACS-Analyse zur Ermittlung der Induktion der Apoptose durch BaP oder Flavonoide in Caco-2-Zellen. Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M je Flavonoid exponiert. (**, $p < 0,05$)

Einfluss von BaP oder Flavonoiden auf den mRNA-Spiegel von Apoptosemarkern in Caco-2-Zellen

Das Flavonoid Galangin steigert in Caco-2-Zellen minimal die mRNA-Spiegel aller hier untersuchten Apoptosemarker: NF κ B, p73, Bax und Bcl-2. Myricetin, Quercetin und Kaempferol haben demgegenüber nahezu keinen Einfluss auf den mRNA-Level der Apoptosemarker. BaP zeigt lediglich eine leichte Steigerung sowohl von Bax als auch von Bcl-2 (siehe Abbildung 17).

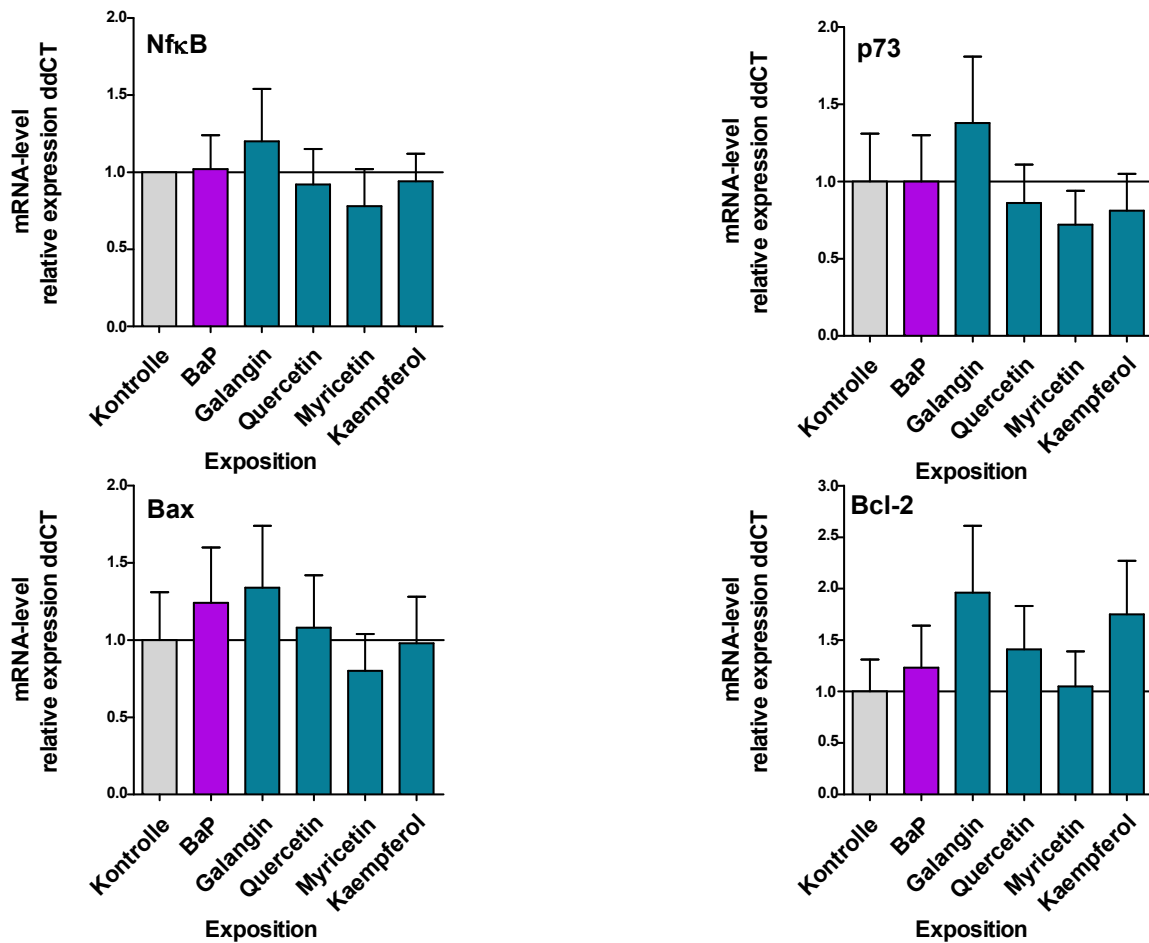


Abbildung 17: Auswirkung von BaP und Flavonoiden auf den relativen mRNA-Spiegel von Apoptosemarkern in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR). Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP oder je 10 μ M pro Flavonoid (G, Q, M, K) inkubiert. Als Kontrolle dienten mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen.

Einfluss von BaP oder Flavonoiden auf die Proteininduktion von Apoptosemarkern in Caco-2-Zellen

In Abbildung 18 wird gezeigt, dass die Proteininduktion des pro-apoptotischen Marker-Proteins Bax sowohl durch BaP, als auch durch Flavonoide gegenüber der Kontrolle gesteigert wird. Die Induktion des anti-apoptotischen Bcl-2 wird durch BaP und Galangin nicht verändert. Lediglich Quercetin scheint einen leicht hemmenden Effekt auf den Bcl-2 Proteinspiegel zu besitzen.

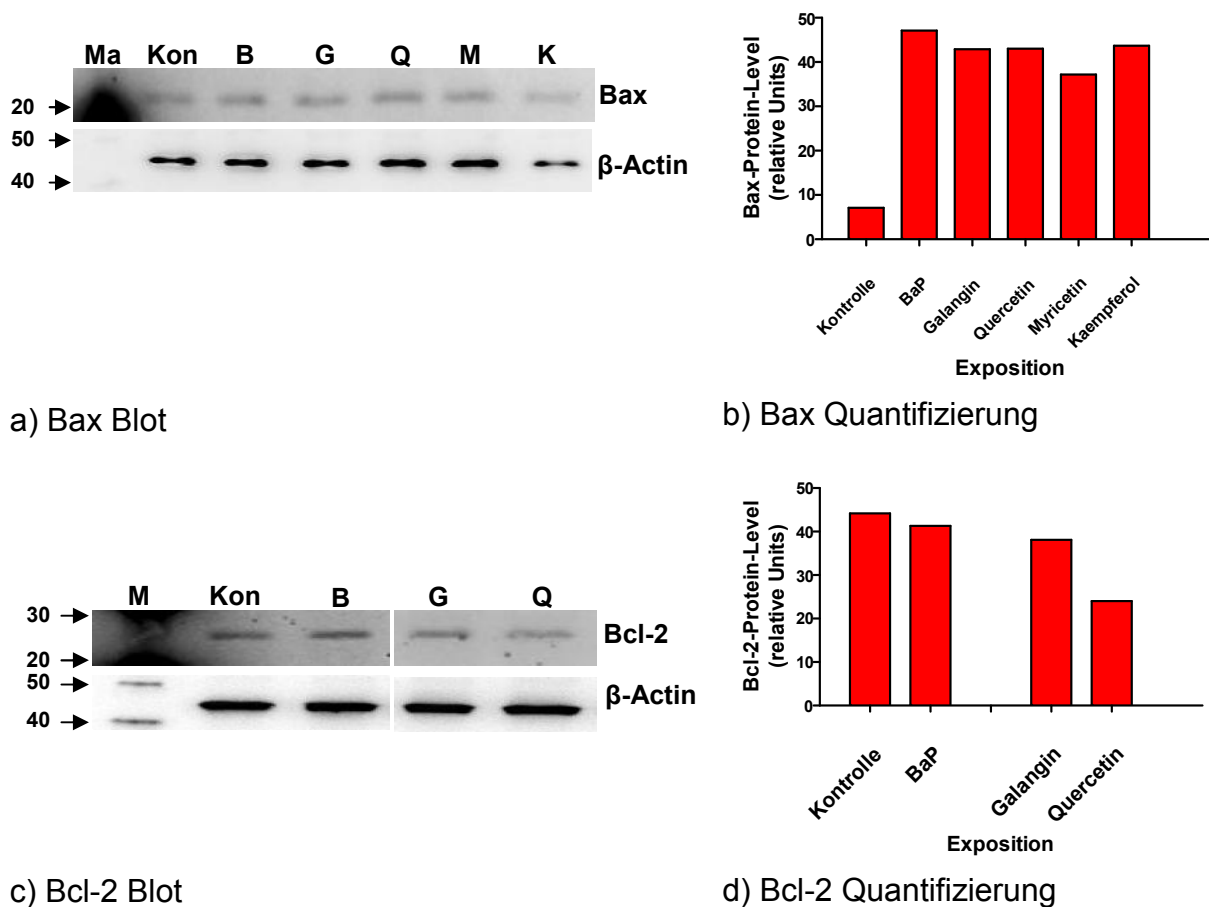


Abbildung 18: Nachweis von BaP- und Flavonoid-Effekten auf die Proteinspiegel der Apoptosemarker Bax und Bcl-2 in Caco-2-Zellen (M: Proteingrößenmarker). a,c) repräsentative Western-Blots (n = 3). b,d) Quantifizierung der Bax und Bcl-2-Blotbanden, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert.

Beeinflussung der Caspase-3- Aktivität durch BaP oder Flavonoide in Caco-2-Zellen

Exposition von Caco-2-Zellen mit BaP bewirkt einen signifikanten Anstieg ($p = 0,001$) der Caspase-3-Aktivität, 2,2-fach stärker gegenüber der Kontrolle, während Quercetin und Galangin selbst keinen Einfluss auf die Aktivität der Caspase-3 besitzen (siehe Abbildung 19).

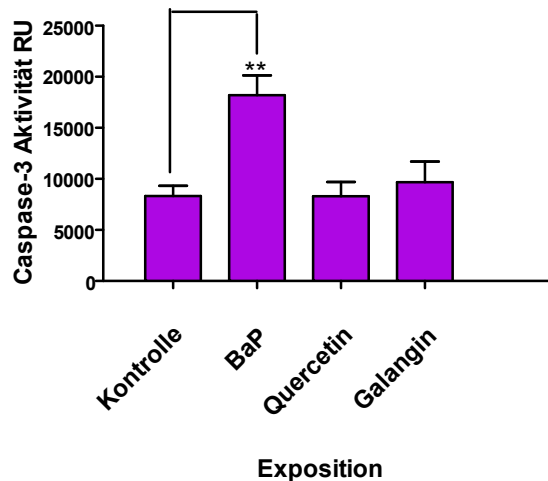


Abbildung 19: Beeinflussung der Caspase-3-Aktivität durch BaP oder Flavonoide in Caco-2-Zellen.

Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP oder je 10 μ M Flavonoid inkubiert. (**, $p < 0,05$). Für die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurde das Caspase-3/CPP32 Fluorometric Assay Kit von BioVision (cat: K105-200) verwendet.

6.2.3 Einfluss von BaP und Flavonoiden auf den Zellzyklus in Caco-2-Zellen

Nachdem ein deutlicher Einfluss von BaP und teilweise der Flavonoide auf die Induktion der Apoptose festgestellt werden konnte, stellt sich jetzt die Frage, ob auch ein solcher generell auf den Zellzyklus besteht. Dies soll mit Hilfe von FACS-Analysen in Caco-2-Zellen überprüft werden (Abbildung 20). Des Weiteren soll die Wirkung von BaP und Flavonoiden auf den mRNA- und Protein-Spiegel Zellzyklus-relevanter Komponenten mittels Real-Time-PCR (Abbildung 21) ermittelt werden. Zusätzlich wurde mittels Immunfluoreszenz (Abbildung 22) und Western-Blot (Abbildung 23) die Induktion der Phosphorylierung des als Tumorsuppressor bekannten Retinoblastoma-Proteins untersucht.

Bei allen Versuchen wurden Caco-2-Zellen für 24 h mit 0,1% DMSO (Lösemittel-Kontrolle), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert. Nocodazol wurde bei der FACS-Analyse als Positiv-Kontrolle für eine G2-Arretierung verwendet. Alle Versuche wurden in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

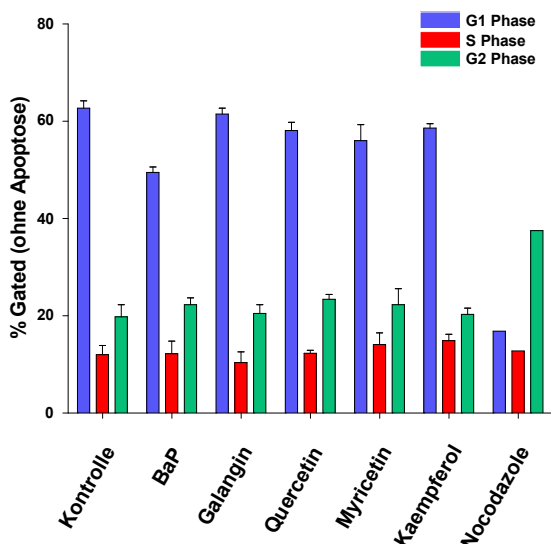


Abbildung 20: Bestimmung des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf den Zellzyklus in Caco-2-Zellen durch FACS-Analyse.

Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert. Nocodazole wurde als Kontrolle verwendet es arretiert die Zellen in der G2-Phase. (n = 3)

Weder BaP noch die Flavonoide verursachen in den eingesetzten Konzentrationen keine Veränderungen des Zellzyklus in Caco-2-Zellen.

Einfluss von BaP und Flavonoiden auf den mRNA-Spiegel Zellzyklus-relevanter Komponenten in Caco-2-Zellen

Die mRNA-Spiegel der Zellzyklus-relevanten Komponenten, p21, p27 und c-jun, werden nicht oder nur marginal durch BaP oder die Flavonoide beeinflusst (Abbildung 21).

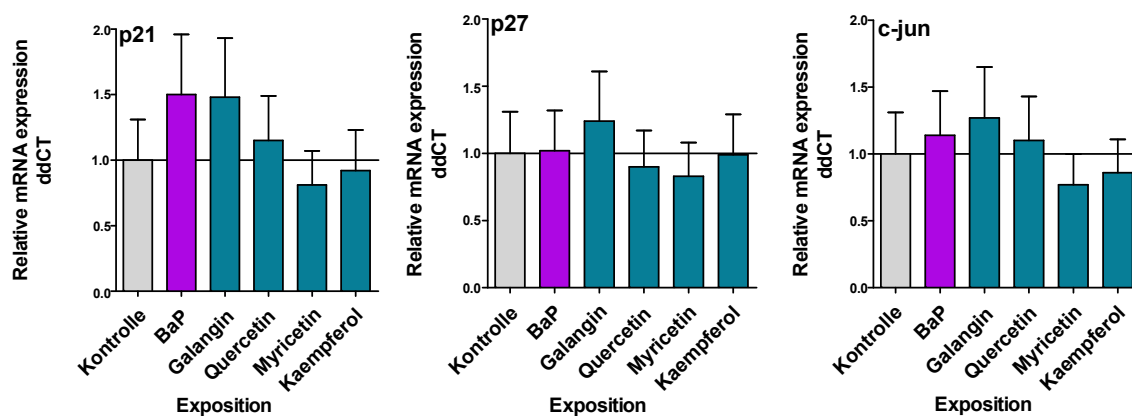


Abbildung 21: Einfluss von BaP und Flavonoiden auf den mRNA-Spiegel Zellzyklus-relevanter Komponenten in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).

Die Zellen wurden 24 h mit der Kontrolle (0,1 % DMSO), 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M je Flavonoid inkubiert. (* , p < 0,05) (n = 3)

Einfluss von BaP oder Flavonoiden auf die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins in Caco-2-Zellen

Der Nachweis der pRb-Phosphorylierung erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden, Immunfluoreszenz und Western-Blot Analyse. Sowohl BaP, als auch Quercetin bewirken eine deutliche Induktion der Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen (Abbildung 22 & Abbildung 23)

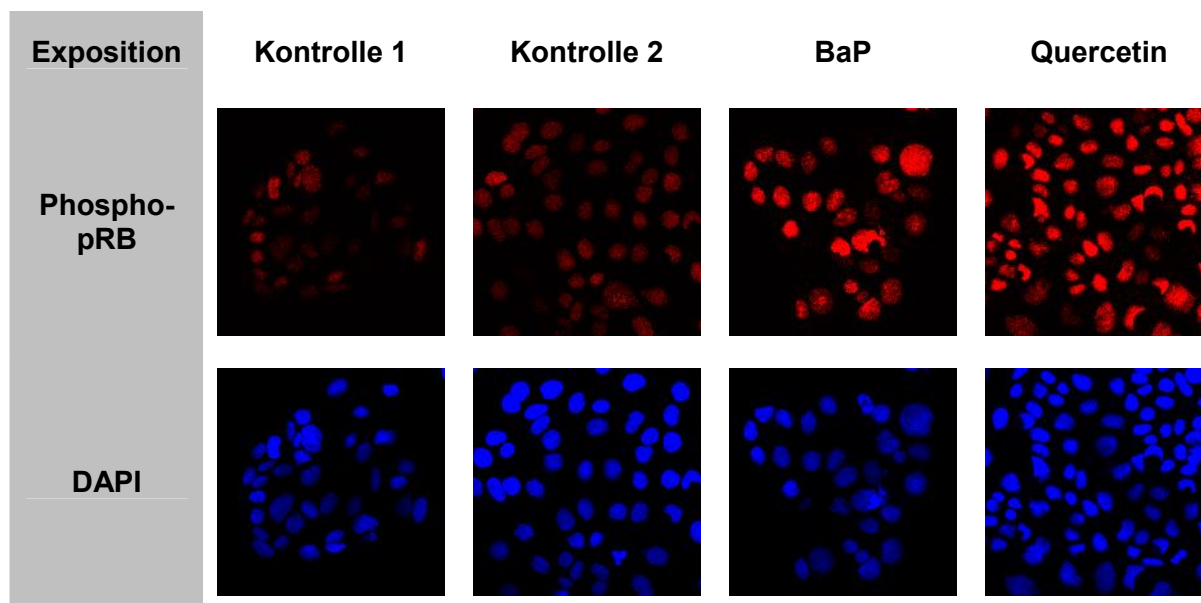
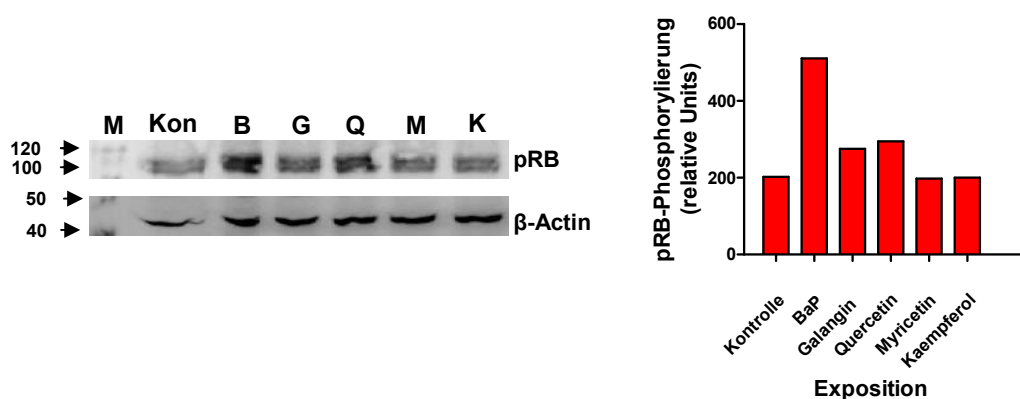


Abbildung 22: Nachweis der Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen über Immunfluoreszenz.

Das phospho-pRb wurde mit einem spezifischen *Erstantikörper* und einem Cy3-markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht, die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und 10 μ M Quercetin inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte sowie mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen.



a) pRB Blot

b) pRB Quantifizierung

Abbildung 23: BaP- und Flavonoideffekte auf die Phosphorylierung des pRb-Proteins in Caco-2-Zellen

a) repräsentativer Western-Blot (M: Proteingrößenmarker). b) Quantifizierung der Western-Blot-Banden der pRb-Phosphorylierung, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert.

BaP induziert die Rb-Protein-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen um 150 % gegenüber der Kontrolle. Quercetin und Galangin zeigen ebenfalls eine leichte Induktion der Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen (Abbildung 23).

6.2.4 Einfluss von BaP und Flavonoiden auf die Expression der Komponenten des AhR-Signalweges in Caco-2-Zellen

Zur Überprüfung, ob BaP oder die Flavonoide in der Lage sind Komponenten des AhR-Signalweges (AhR, AhRR, ARNT und AIP) und der Zielgene (CYP1A1 und CYP1B1) auf mRNA- oder Protein-Ebene zu beeinflussen (Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 26 & Abbildung 27), wurden Caco-2-Zellen mit 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid für 24 h inkubiert. Als Kontrolle dienten mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen (Lösemittelkontrolle). Zur Ermittlung der Wirkung auf mRNA- und Protein-Ebene der Komponenten wurden Real-Time-PCR und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Alle Versuche wurden in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

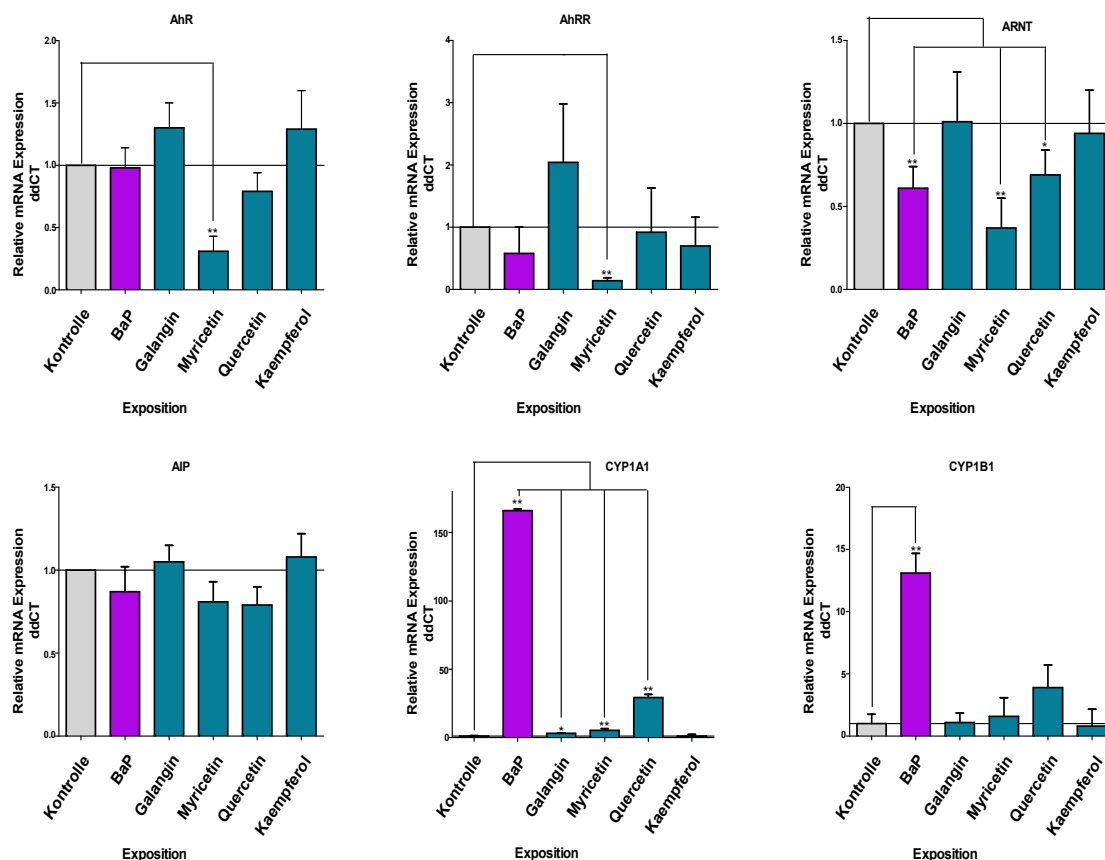
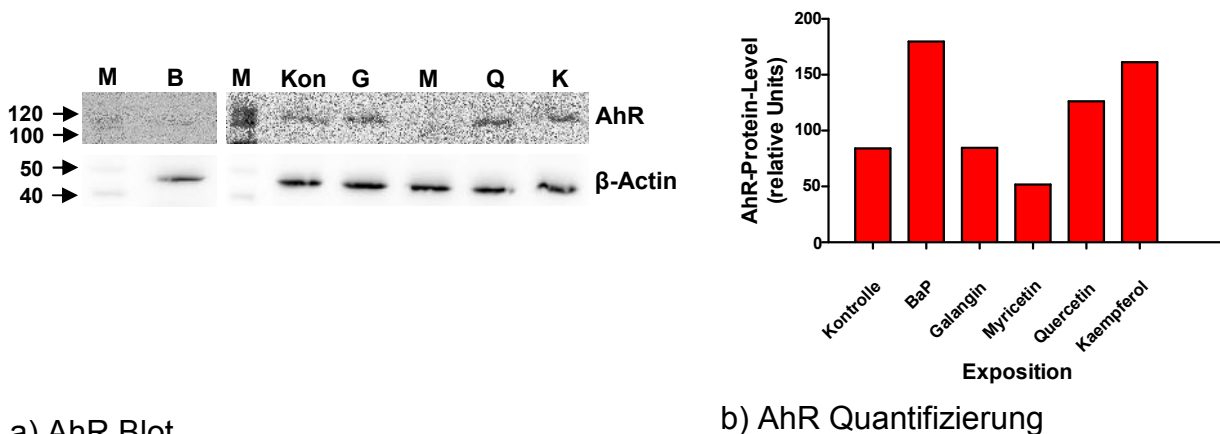


Abbildung 24: Nachweis der Veränderungen des mRNA-Levels der Komponenten des AhR-Signalweges in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR). Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M je Flavonoid inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet. (*, $p < 0,05$ // **, $p < 0,01$)

In Abbildung 24 sieht man, dass die mRNA-Level der AhR-Signalweg-Komponenten AhR, AhRR und AIP werden weder durch BaP noch durch die Flavonoide Galangin, Quercetin und Kaempferol beeinflusst. Lediglich Myricetin hat auf das mRNA-Niveau der Komponenten AhR und AhRR einen signifikant supprimierenden Effekt um 70 % bzw 85 % ($p < 0,001$). Der ARNT-mRNA-Level wird signifikant durch BaP um 40 % ($p = 0,007$), durch Myricetin um 60 % ($p = 0,004$) und durch Quercetin um 30 % ($p = 0,023$) gegenüber der Kontrolle abgesenkt.

Der Transkript-Spiegel des Zielgens CYP1A1 des AhR-Signalweges wird signifikant durch BaP um den Faktor 166 ($p < 0,001$), durch Galangin um den Faktor 3 ($p = 0,013$), durch Myricetin um den Faktor 5 ($p = 0,008$) und durch Quercetin um den Faktor 30 ($p < 0,001$) gesteigert. Die mRNA des ebenfalls AhR-regulierten CYP-Enzyms CYP1B1 wird lediglich durch BaP signifikant gesteigert ($p < 0,001$).



a) AhR Blot

b) AhR Quantifizierung

Abbildung 25: BaP- und Flavonoideffekte auf die Induktion des AhR-Proteins in Caco-2-Zellen.

a) repräsentativer Western-Blot (M: Proteingrößenmarker b) Quantifizierung der Western-Blot-Banden von AhR, normiert auf β-Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μM BaP und je 10 μM Flavonoid inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet.

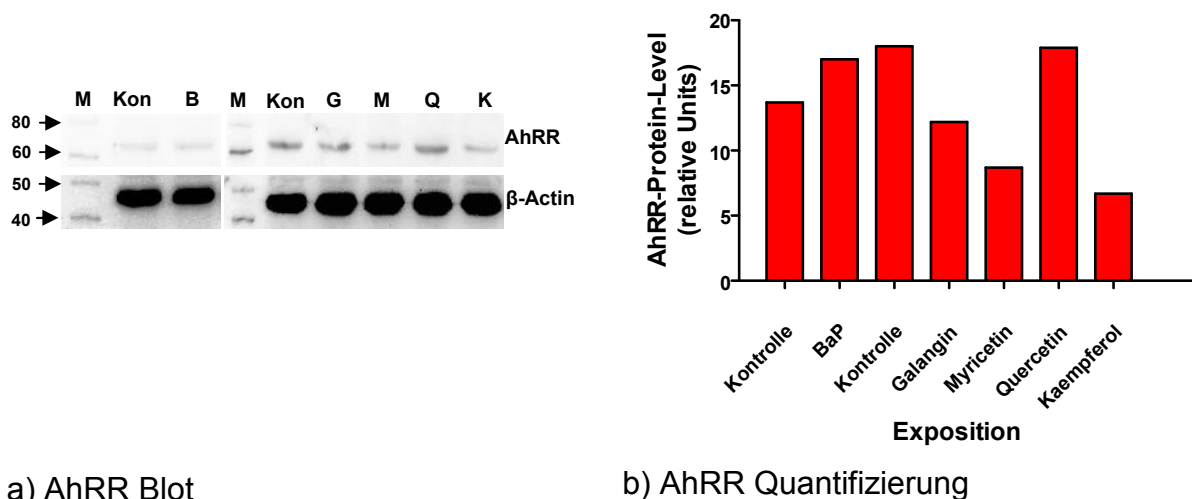


Abbildung 26: BaP- und Flavonoideffekte auf die Induktion des AhRR-Proteins in Caco-2-Zellen.
a) repräsentativer Western-Blot (M: Proteingrößenmarker). b) Quantifizierung der Western-Blot-Banden von AhRR, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet.

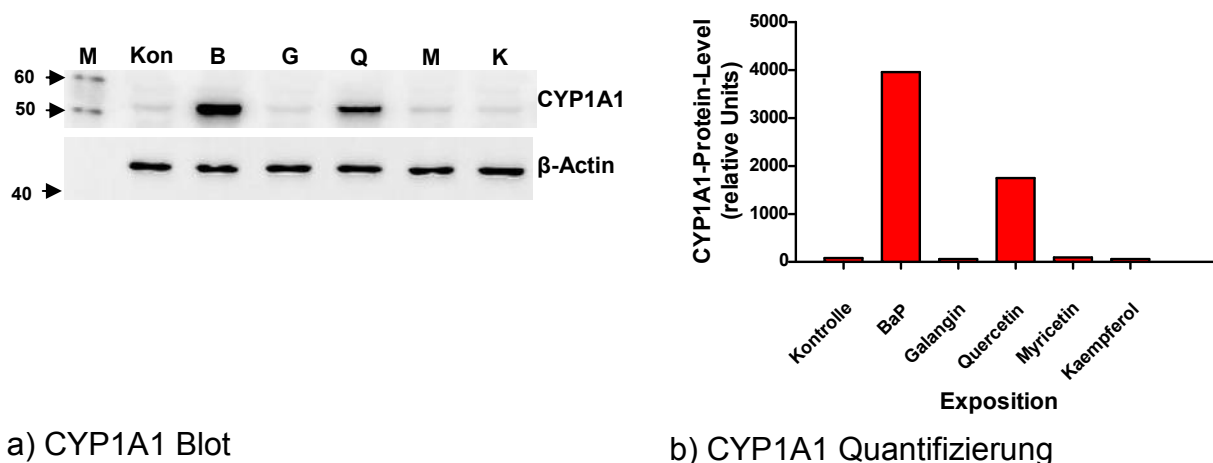


Abbildung 27: BaP- und Flavonoideffekte auf die Induktion des CYP1A1-Proteins in Caco-2-Zellen.
a) repräsentativer Western-Blot (M: Proteingrößenmarker). b) Quantifizierung der Western-Blot-Banden von CYP1A1, nomiert auf β -Actin.. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet.

Der **AhR**-Protein-Spiegel wird durch BaP um 110 % durch Quercetin um 50% und durch Kaempferol um 90 % gesteigert, während Myricetin ihn um ca. 40 % absenkt (Abbildung 25). BaP und Quercetin haben steigern marginal die **AhRR**-Protein-expression (Abbildung 26). BaP und Quercetin erhöhen den **CYP1A1**-mRNA-Spiegel um den Faktor 166 bzw. 30 und den Protein-Spiegel signifikant ca. um den Faktor 4000 bzw. 2000 ($p < 0,001$) (Abbildung 27).

6.2.5 Einfluss von BaP und Flavonoiden auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen

Der Einfluss von BaP und Flavonoiden auf die CYP1A1-Proteinexpression und den mRNA-Spiegel wurde in 6.2.4 bereits gezeigt. Sowohl BaP als auch einige der Flavonoide steigern den mRNA-Spiegel und die Proteinexpression des BaP metabolisierenden P450 Enzyms CYP1A1. Deshalb soll nun ermittelt werden, ob BaP oder die Flavonoide die Enzymaktivität von CYP1A1 steigern können. Hierfür wird ein Ethoxyresorufin-O-deethylase-Assay (EROD) durchgeführt. Für alle Versuche werden die Caco-2-Zellen 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), BaP und Flavonoiden inkubiert. Alle Versuche wurden in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

Konzentrationsabhängige Beeinflussung der CYP1A1-Aktivität (EROD) durch BaP und Flavonoide

Wie Abbildung 28 zeigt, steigert BaP die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen in jeder getesteten Konzentration (1, 5 und 10 μM) gegenüber der Kontrolle signifikant ($p < 0,001$). Jedoch sinkt mit steigender BaP-Konzentration die absolute CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen. Bei Galangin ist ein ähnliches Phänomen zu sehen, die niedrigste Konzentration an Galangin steigert die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen am meisten. Jedoch beeinflussen alle eingesetzten Galangin Konzentrationen signifikant die CYP1A1 Aktivität bezogen auf die Kontrolle, 1 und 5 μM Galangin steigern die CYP1A1-Aktivität, während 10 μM Galangin diese signifikant absenken (1 μM Galangin $p < 0,001$, 5 μM Galangin $p < 0,001$, 10 μM Galangin $p < 0,032$). Mit steigender Konzentration nimmt auch hier die absolute Aktivität des CYP1A1 in Caco-2-Zellen ab. Bei den Flavonoiden Quercetin und Myricetin findet ebenfalls eine sehr hohe Steigerung der CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen statt. Anders als bei BaP und Galangin ist hier eine Aktivitätssteigerung mit steigender Flavonoidkonzentration zu finden. Alle 3 Konzentrationen von Quercetin und Myricetin steigern die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen signifikant ($p < 0,001$). Das Flavonoid Kaempferol bietet bezüglich der CYP1A1-Aktivitätssteigerung ein anderes Bild als die restlichen Flavonoide. Alle eingesetzten Kaempferol-Konzentrationen beeinflussen die CYP1A1-Aktivität zwar signifikant bezogen auf die jeweiligen Kontrollen, die Änderungen sind aber gegenüber BaP, Quercetin oder Myricetin wesentlich geringer. Wie auch bei Galangin, scheint die höchste Konzentration (10

μM) von Kaempferol eher eine inhibierende Wirkung auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen zu besitzen.

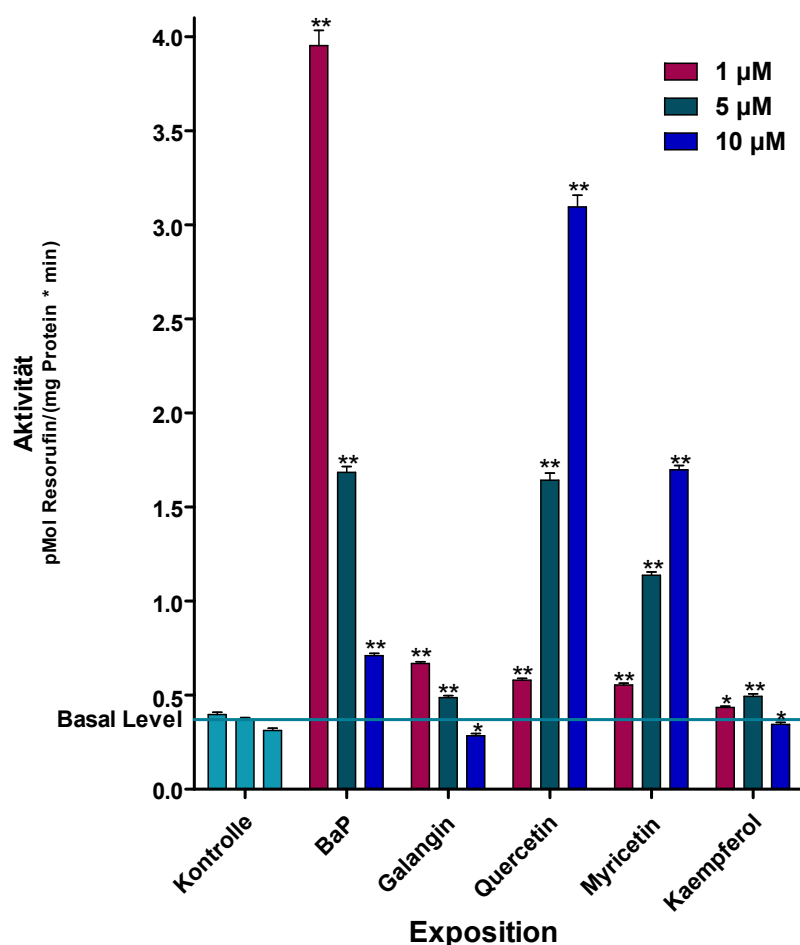


Abbildung 28: Ermittlung der konzentrationsabhängigen Beeinflussung der CYP1A1-Aktivität durch BaP und Flavonoide in Caco-2-Zellen.

Sowohl BaP, als auch Flavonoide wurden in den Konzentrationen 1, 5 und 10 μM für 24 h inkubiert. Die Kontrolle (0,1 % DMSO) wurde für jede einzelne Konzentration separat für 24 h inkubiert. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die entsprechende Kontrolle (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$).

6.2.6 Einfluss von BaP und den Flavonoiden auf andere Signalwege in Caco-2-Zellen

Nachdem die Effekte von BaP und Flavonoiden auf die Komponenten des AhR-Signalweges gezeigt werden konnten, stellt sich nun die Frage, ob solche auch bei anderen Signalwegen der Caco-2-Zellen zu finden sind. Da über die einzelnen MAPK-Signalwege (JNK, ERK und p38) der AhR selbst phosphoryliert werden kann oder aber umgekehrt über den AhR-Signalweg MAPK-Wege aktiviert werden können, sind diese Signalwege auch potentiell durch BaP oder die Flavonoide beeinflussbar. Deshalb soll die Expression von Komponenten und Zielgenen dieser

Signalwege und zusätzlich des AKT-Signalweges untersucht werden, da dieser eine wesentliche Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus oder der Induktion der Apoptose spielt. PTEN ist eine Signalwegskomponente des AKT-Signalweges, welche die Aktivierung von AKT negativ reguliert. Eine weitere Komponente ist PI3K, dessen Aktivierung zu einer Aktivierung von AKT führt. Beide Komponenten PTEN und PI3K agieren über PIP3 und PDK1.

Der Nrf2-Signalweg ist direkt mit dem AhR-Signalweg verbunden, da Nrf2 ein Zielgen des AhR-Signalweges ist. Durch diesen Umstand ist die Aktivierung des Nrf2-Signalweges über den AhR mittels BaP und Flavonoide möglich. Für den Nrf2-Signalweg wird die Expression von Nrf2 selbst und seinem regulierenden Ko-Protein keap1 untersucht. GSTA1, GSTP1, GCS und NQO1 sind Zielgene des Nrf2-Signalweges.

Bei allen genannten Signalwegen werden sowohl der mRNA-Spiegel, als auch die Veränderungen in der Proteinexpression durch BaP oder Flavonoide untersucht. Für alle Versuche werden die Caco-2-Zellen 24 h mit der 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid inkubiert. Als Kontrolle dienen mit 0,1 % behandelte Zellen (Lösungsmittelkontrolle). Alle Versuche wurden in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

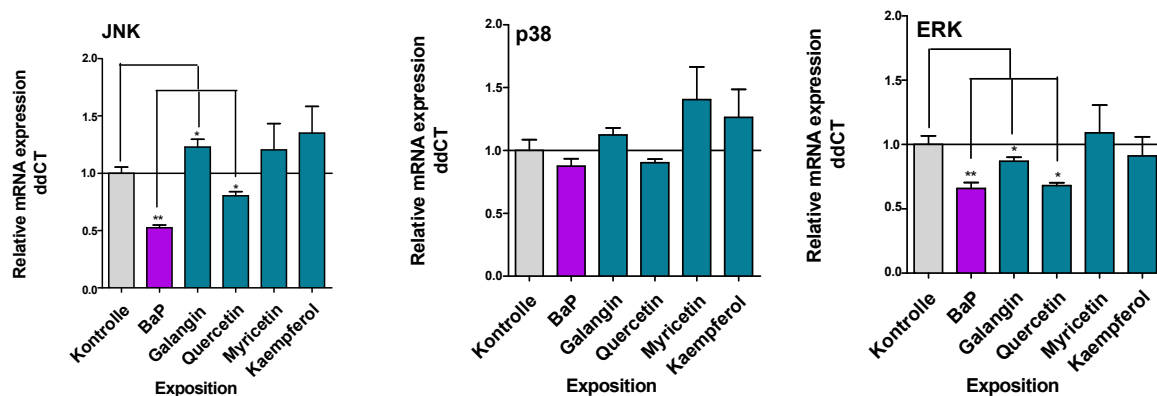


Abbildung 29: Nachweis der Veränderungen des mRNA-Spiegels der MAPK in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.

Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet. (*, $p < 0,05$ // **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

Nach Abbildung 29 wird der mRNA-Level der JNK durch BaP um 48 % ($p < 0,001$) und Quercetin um 20 % ($p = 0,006$) signifikant gegenüber der Kontrolle in Caco-2-Zellen abgesenkt. Galangin hingegen steigert den JNK-mRNA -Spiegel um 23 % ($p = 0,01$) gegenüber der Kontrolle in Caco-2-Zellen. Das mRNA-Niveau der MAPK p38

wird weder durch BaP noch durch Flavonoide signifikant in Caco-2-Zellen beeinflusst. Der mRNA-Spiegel der dritten MAPK ERK wird durch BaP um 35 %, Galangin um 13 % und Quercetin um 32 % signifikant gegenüber der Kontrolle in Caco-2 abgesenkt (BaP: $p = 0,002$ // Galangin: $p = 0,038$ // Quercetin $p = 0,001$).

Proteinexpression der **MAPK** in Caco-2-Zellen

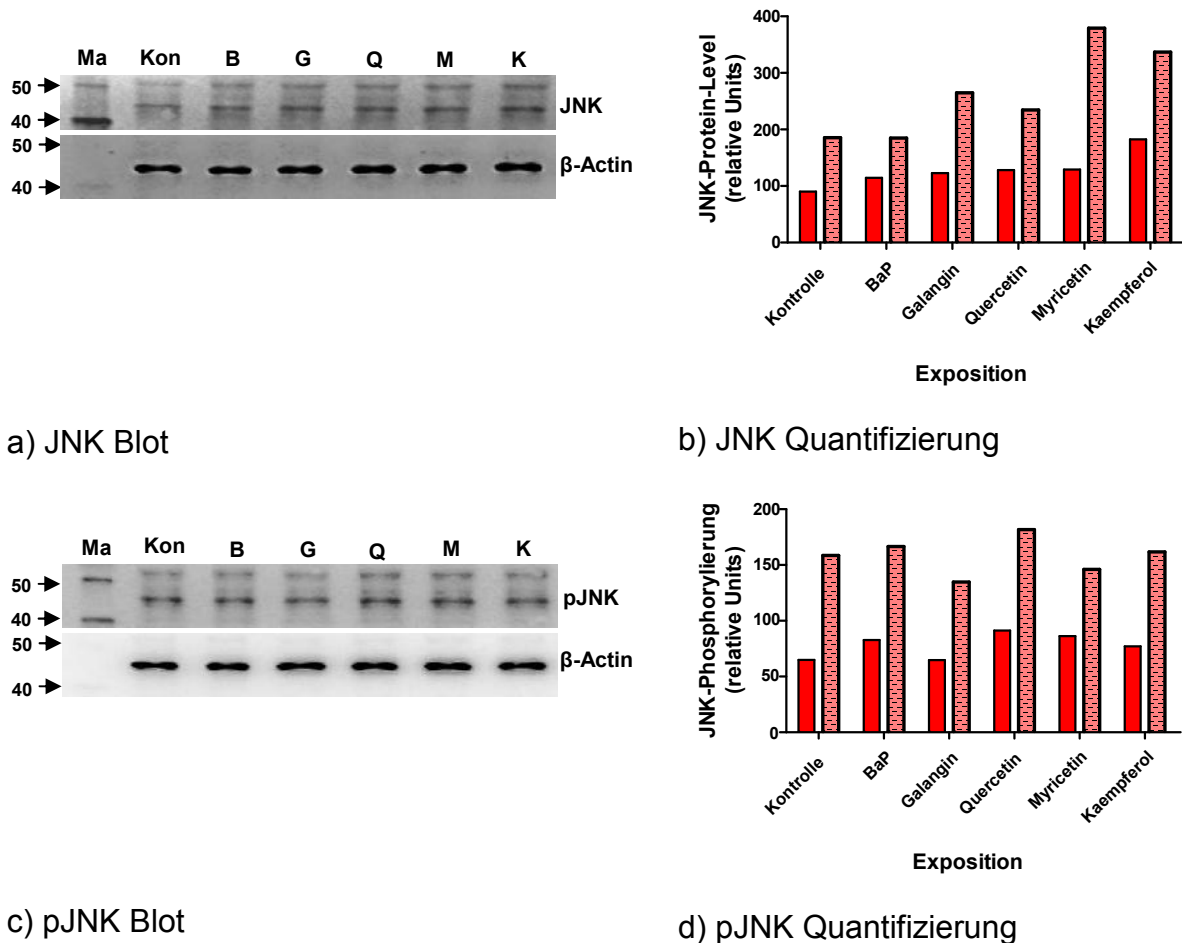
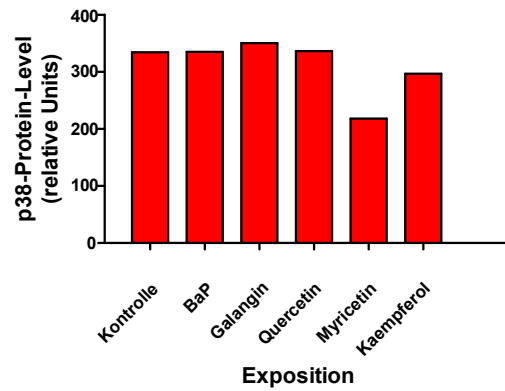
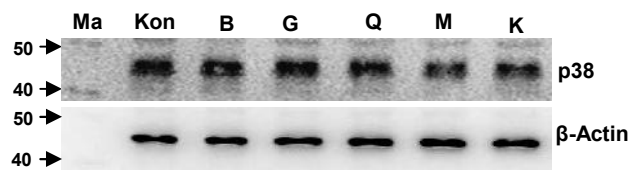
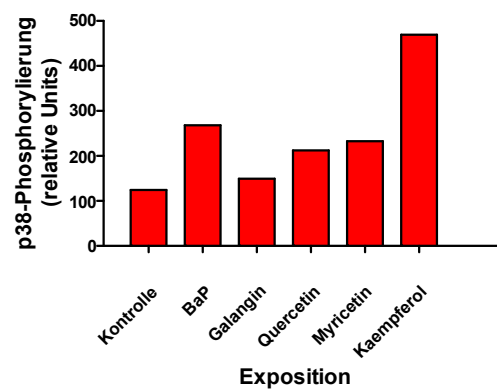
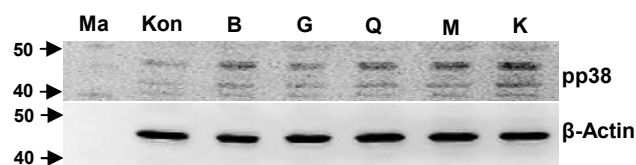


Abbildung 30: Nachweis des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf die Proteinexpression der MAPK JNK und dessen Phosphorylierung in Caco-2-Zellen (Western-Blot) (M = Proteingrößenmarker). a, c: repräsentative Western-Blots ($n = 3$). b, d: Quantifizierung der Western-Blot-Banden von JNK und pJNK, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet.



a) p38 Blot

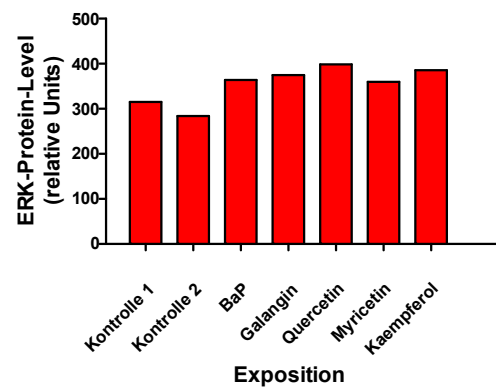
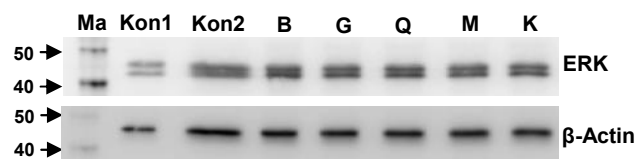
b) p38 Quantifizierung



c) Phospho-p38 Blot

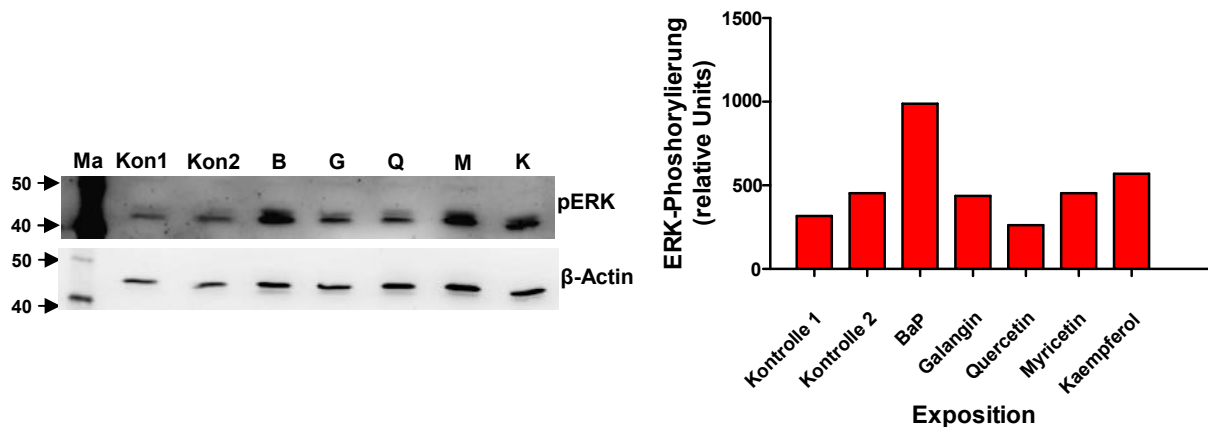
d) Phospho-p38 Quantifizierung

Abbildung 31: Nachweis des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf die Protein-expression der MAPK p38 und dessen Phosphorylierung in Caco-2-Zellen (Western-Blot) (M = Proteingrößenmarker). a, c: repräsentative Blots. b, d: Quantifizierung der Western-Blot-Banden von p38 und p-p38, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit der 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid inkubiert.



a) ERK Blot

b) ERK Quantifizierung



c) pERK Blot

d) pERK Quantifizierung

Abbildung 32: Nachweis des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf die Proteinexpression der MAPK ERK und dessen Phosphorylierung in Caco-2-Zellen (Western-Blot) (M: Proteingrößenmarker). a, c: repräsentative Blots. b, d: Quantifizierung der Western-Blot-Banden von ERK und p-ERK, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit der 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid inkubiert.

Die Beeinflussung des mRNA-Spiegels der MAPK JNK, p38 und ERK (Abbildung 29) spiegelt sich nicht auf der Protein-Ebene wieder. Weder der Protein-Spiegel der JNK noch deren Phosphorylierung wird durch BaP oder Flavonoide verändert (Abbildung 30). Die Phosphorylierung der p38 wird durch BaP um ca. 100 % und durch Kaempferol um ca. 300 % gegenüber der Kontrolle induziert (Abbildung 31). Der ERK-Protein-Spiegel wird ebenfalls nicht gegenüber der Kontrolle verändert, wohl aber wird Phospho-ERK durch BaP um ca. 120 % gegenüber der Lösemittelkontrolle erhöht (Abbildung 32).

Welchen Einfluss haben BaP und die Flavonoide auf den mRNA-Spiegel der AKT-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen?

Der Einfluss von BaP und Flavonoiden auf den mRNA-Spiegel der AKT-Signalwegskomponenten wird in Abbildung 33 gezeigt. Der mRNA-Level von AKT selbst, wird weder durch BaP noch durch Flavonoide verändert. Der PTEN-mRNA-Spiegel wird in Caco-2-Zellen durch BaP und Quercetin um 34 % und durch Galangin um 45 % signifikant abgesenkt (BaP: $p = 0,004$ // Galangin: $p = 0,001$ // Quercetin: $p = 0,004$). Von den eingesetzten Flavonoiden ist nur Myricetin in der Lage den mRNA-Spiegel von PTEN um 43 % zu steigern. Der mRNA-Spiegel von PI3K wird durch BaP um 27 %, Quercetin um 220 % und durch Kaempferol um 240 % signifikant gesteigert (BaP: $p = 0,008$ // Quercetin: $p < 0,001$ // Kaempferol: $p < 0,001$), während

Galangin und Myricetin den mRNA-Spiegel von PI3K signifikant gegenüber der Kontrolle um 24 % bzw. 29 % absenken (Galangin: $p = 0,004$ // Myricetin: $p = 0,004$).

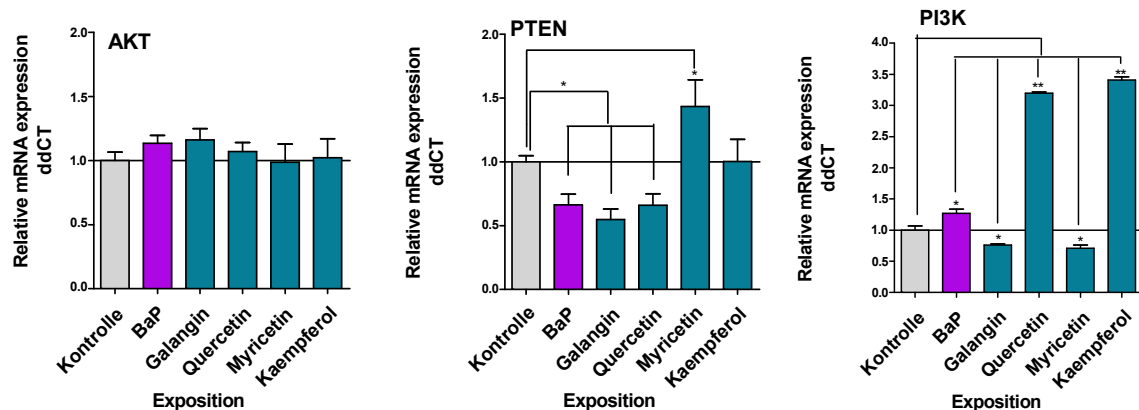
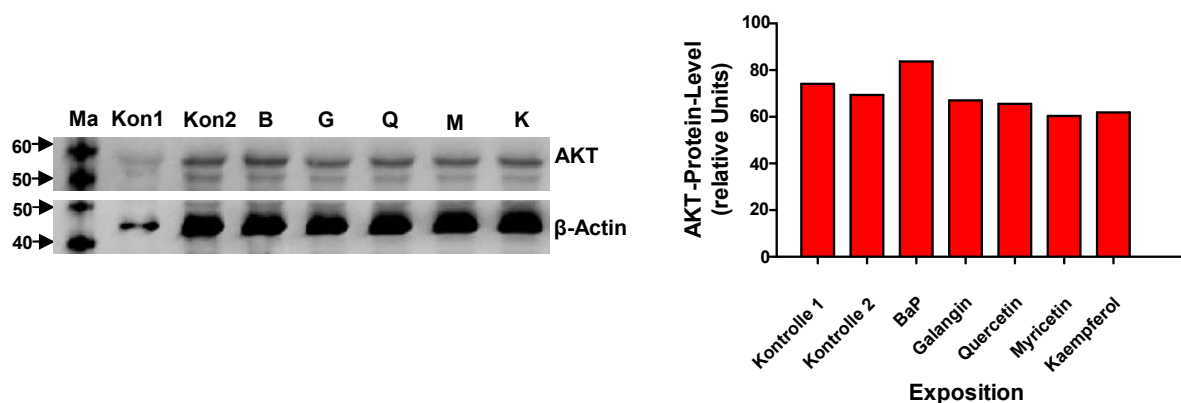


Abbildung 33: Nachweis der Veränderungen des mRNA-Spiegels von AKT-Signalwegskomponenten (AKT) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert. (*, $p < 0,05$ // **, $p < 0,01$)($n = 3$)

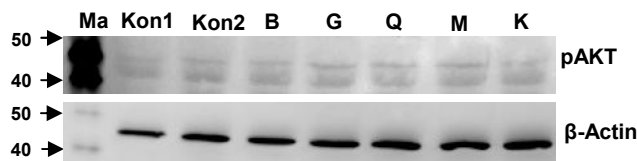
Proteinexpression von AKT-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen

Der AKT Protein-Level (Abbildung 34) wie auch der mRNA-Level (Abbildung 33) werden weder durch BaP noch durch Flavonoide verändert. Auf der Proteinebene kann aber eine durch BaP ca. 230 % gesteigerte Induktion der AKT-Phosphorylierung gegenüber der Lösemittelkontrolle in Caco-2-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 34). Jedoch ist eine Steigerung des PI3K-Protein-Spiegels durch BaP oder Flavonoide, welche die Phosphorylierung von AKT antreibt, nicht zu bestätigen (Abbildung 34). Auch der Protein-Level des AKT-Zielproteins, GSK-3, welche durch die AKT Phosphorylierung reguliert wird, wird nicht durch BaP oder Flavonoide gesteigert (Abbildung 34).

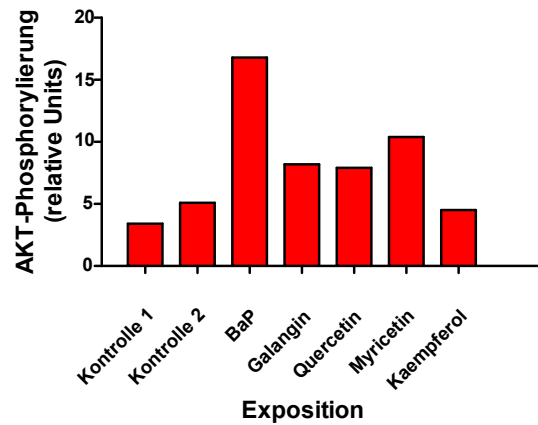


a) AKT Blot

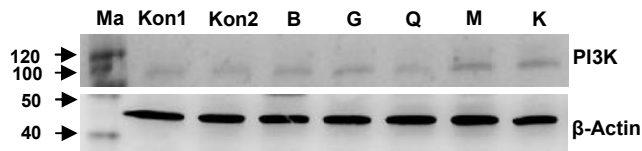
b) AKT Quantifizierung



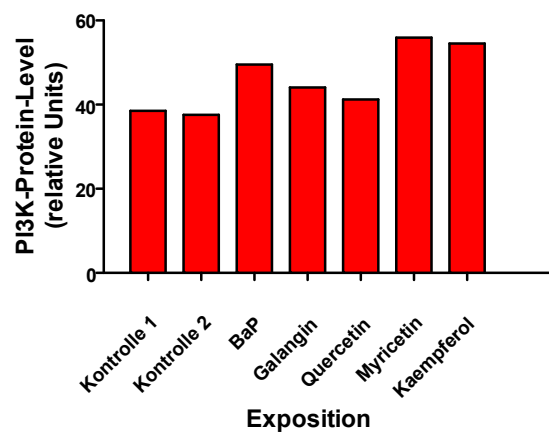
c) pAKT Blot



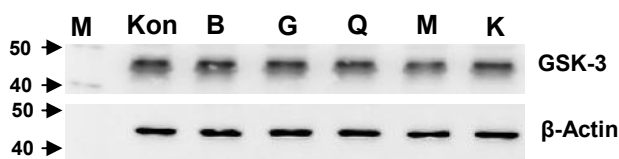
d) pAKT Quantifizierung



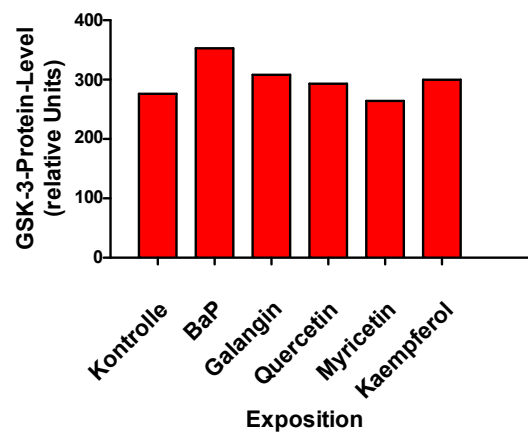
e) PI3K Blot



f) PI3K Quantifizierung



g) GSK-3 Blot



h) GSK-3 Quantifizierung

Abbildung 34. Nachweis des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf die Proteinexpression der AKT-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen (Western-Blot). a, c, e, g: repräsentative Blots. b, d, f, h: Quantifizierung der Western-Blot-Banden von AKT, pAKT, PI3K und GSK-3, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle (1) verwendet.

Einfluss von BaP und Flavonoiden auf den mRNA-Level der Nrf2-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen?

In Abbildung 35 werden die Effekte von BaP und Flavonoiden auf die Nrf2-Signalwegskomponenten gezeigt. Der mRNA-Spiegel von Nrf2 selbst und seinem Regulatorprotein keap1 werden weder durch BaP noch durch Flavonoide gesteigert. Auch der mRNA-Level des Nrf2-Zielgens, GSTP1, wird nicht beeinflusst oder ggf. durch BaP marginal erhöht. Der mRNA-Spiegel von GSTA1 wird signifikant durch Galangin um 650 % erhöht ($p < 0,001$). Die Flavonoide Galangin, Myricetin und Quercetin senken den mRNA-Level von GCS signifikant gegenüber der Kontrolle um 26 %, 35 % bzw. 43 % (Galangin: $p < 0,001$ // Quercetin: $p < 0,001$ // Myricetin $p = 0,007$). Während der mRNA-Spiegel von NQO1 durch Flavonoide nicht beeinflusst wird, kann BaP diesen um 64 % signifikant gegenüber der Kontrolle in Caco-2-Zellen induzieren ($p = 0,013$).

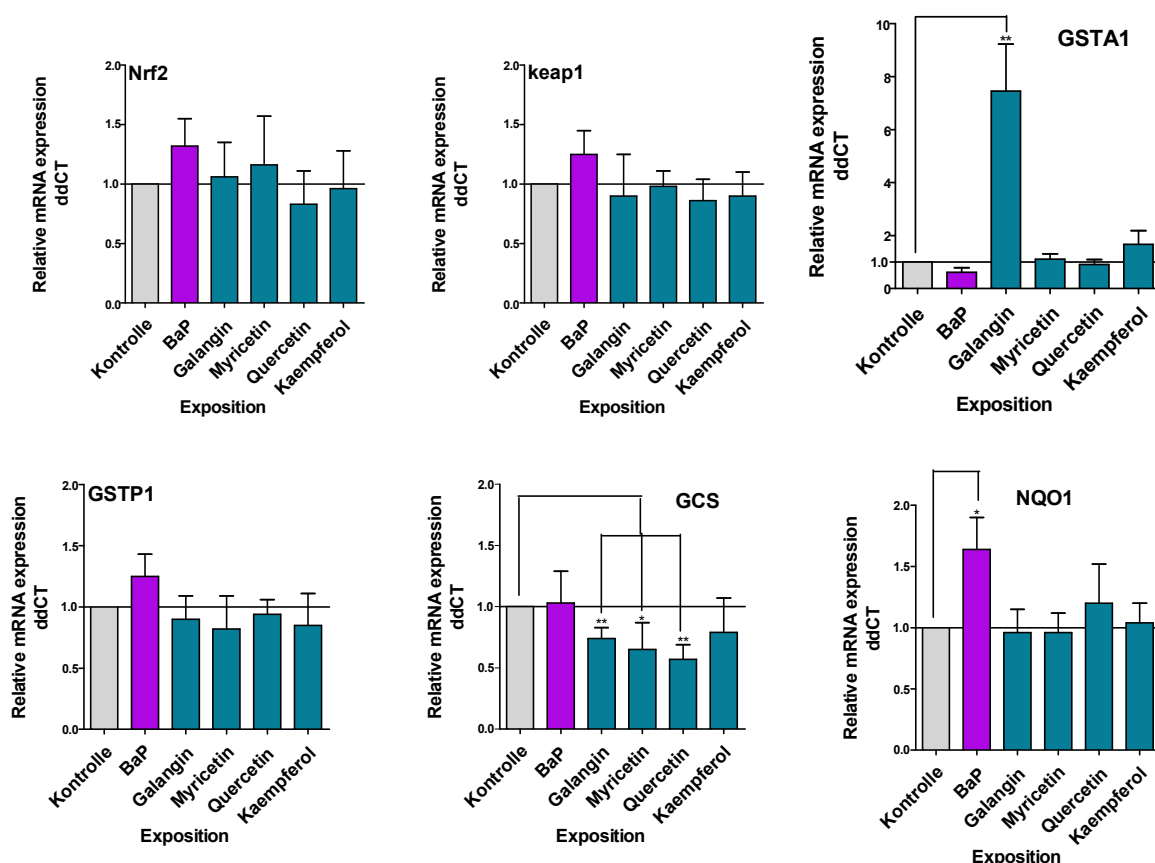


Abbildung 35: Einfluss von BaP und Flavonoiden auf die mRNA-Spiegel von Komponenten des Nrf2-Signalweges in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).

Die Zellen wurden 24 h mit der 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert. ($n = 3$).

Proteinexpression der **Nrf2**-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen

Die Proteinexpression von Nrf2 wird lediglich durch Galangin um ca. 80 % und durch Kaempferol um ca. 70 % induziert. Die Proteinexpression von GSTP1 hingegen wird weder durch BaP, noch durch die Flavonoide verändert (Abbildung 36).

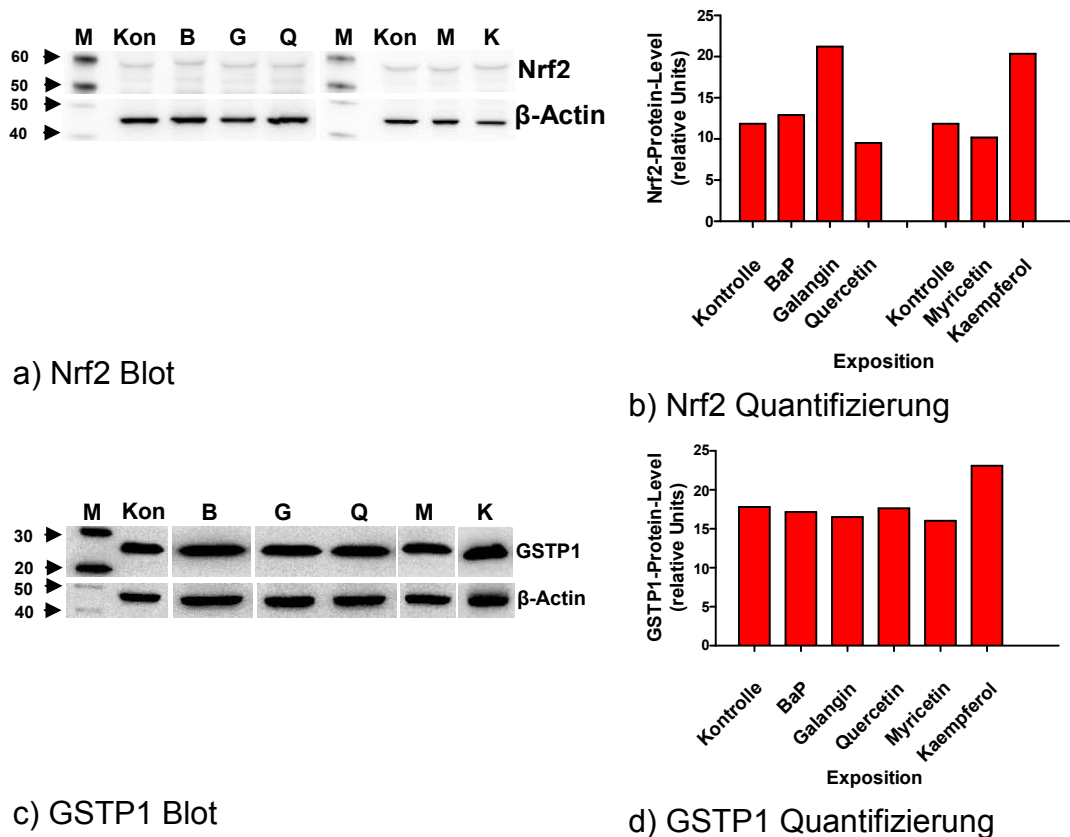


Abbildung 36: Nachweis des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf die Proteinexpression der Nrf2-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen (M = Proteingrößenmarker). a, c: repräsentative Blots. b, d: Quantifizierung der Western-Blot-Banden von Nrf2 und GSTP1, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid inkubiert.

6.3 Antagonistisches Verhalten der Flavonoide gegenüber BaP-medi- ierten Effekten in Caco-2-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass BaP und in geringerem Maße auch die Flavonoide alleine verschiedene Effekte in Caco-2-Zellen hervorrufen, soll nun geklärt werden, ob Flavonoide die durch BaP-hervorgerufenen Effekte in Caco-2-Zellen beeinflussen.

6.3.1 Flavonoideffekte auf die BaP-medierte DNA-Schädigung in Caco-2- Zellen

Zur Überprüfung, ob die BaP-induzierte Ausbildung von DNA-Strangbrüchen durch Flavonoide beeinflusst werden kann, wurde zunächst ein Comet-Assay durchgeführt (Abbildung 37 & Abbildung 38). Zusätzlich wurde die phosphorylierte Isoform des Histons H2A, γ H2Ax, als Strangbruch-Indikator mittels Western-Blot-Analyse (Abbildung 40) und Immunfluoreszenz (Abbildung 39) in Dreifachbestimmung untersucht.

Die Caco-2-Zellen wurden zuvor ohne Zusätze (Kontrolle 1, unbehandelt) und mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 10 μ M BaP, 3 μ M BaP einzeln und in Kombination mit jeweils 10 μ M der Flavonoide Galangin, Quercetin, Myricetin und Kaempferol für 24 h inkubiert bzw. ko-inkubiert.

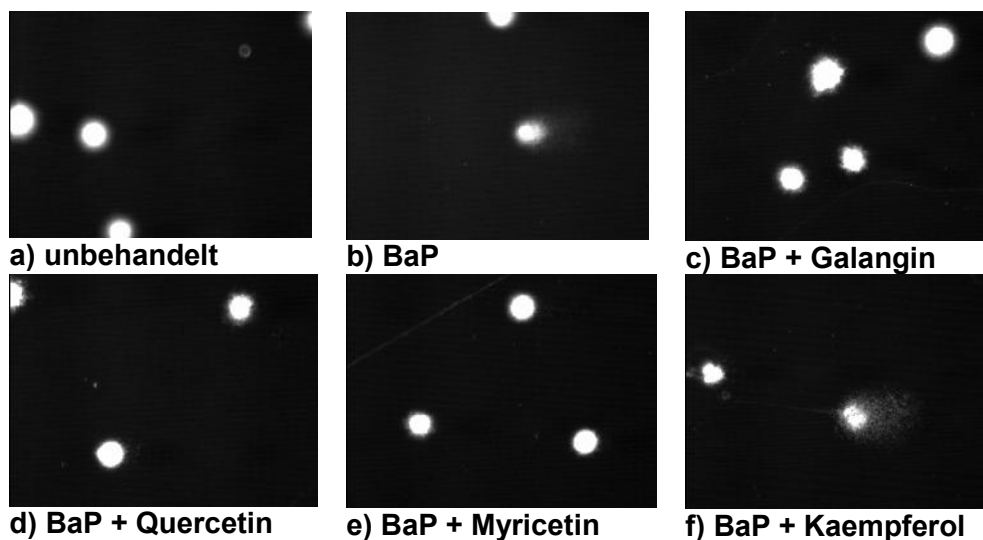


Abbildung 37: Effekte von BaP-Flavonoid-Kombinationen auf DNA-Schäden in Caco-2-Zellen (Comet-Assay).

Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid exponiert bzw. ko-exponiert (b-f). a, unbehandelte Zellen (Mediumkontrolle).

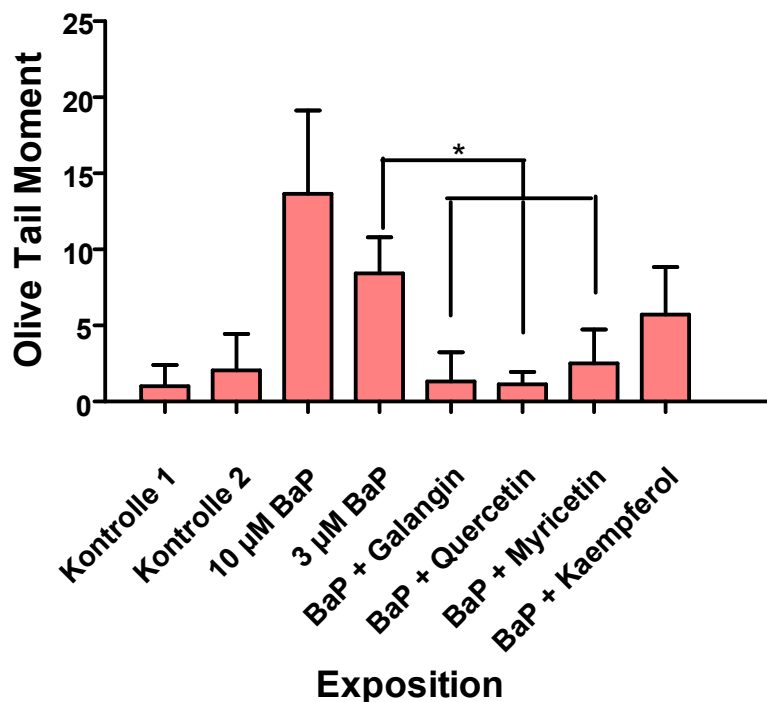


Abbildung 38: Quantifizierung der im Comet-Assay nachgewiesenen DNA-Strangbrüche über das Olive tail moment.

Beschreibung der Durchführung siehe Abbildung 37. (*, $p < 0,05$)

Die Flavonoide Galangin, Quercetin und Myricetin sind in der Lage die durch BaP induzierten DNA-Schäden in Caco-2-Zellen signifikant zu senken und nahezu auf das Niveau der Kontrolle zu bringen (Galangin: $p = 0,016$; Quercetin: $p = 0,007$; Myricetin: $p = 0,035$). Allein die Kombination mit Kaempferol zeigt diesen Effekt weniger stark ausgeprägt (Abbildung 38).

Nachweis von Flavonoideffekten auf BaP-mediierte DNA-Schäden in Caco-2-Zellen über die γ H2Ax-Induktion

BaP-behandelte Caco-2-Zellen zeigen gegenüber der Kontrolle eine starke Zunahme von γ H2Ax im Nukleus. Die Wirkung von Flavonoiden wurde beispielhaft nur mit Quercetin untersucht. Es ist in der Lage die BaP-mediierte Induktion von γ H2Ax zu reduzieren.

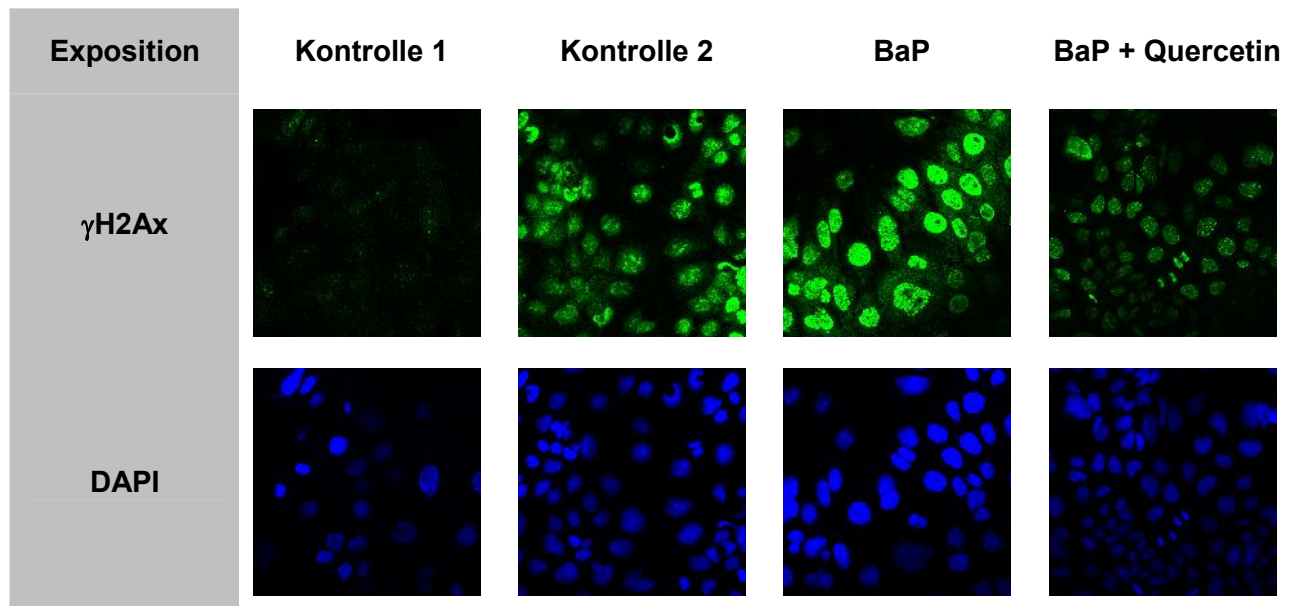
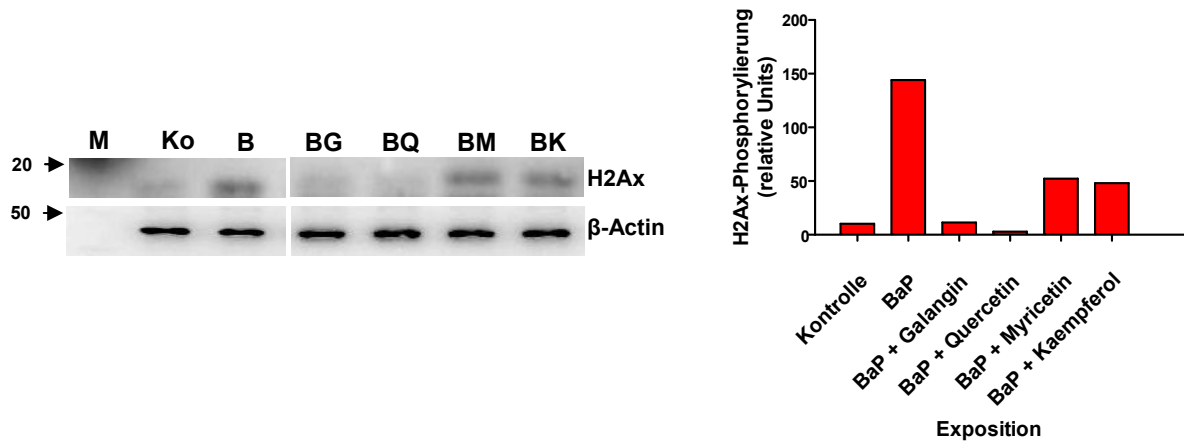


Abbildung 39: Nachweis der γ H2Ax-Induktion in Caco-2-Zellen mittels Immunfluoreszenz.

γ H2Ax wurde mit einem spezifischen AlexaFluor488 -markierten Zweitantikörper markiert, die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und 10 μ M Quercetin ko-inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte (1) und mit 0,1 % DMSO (2) behandelte Zellen.

Die Western-Blot-Analyse des γ H2Ax-Protein-Spiegel stützt die zuvor in der Immunfluoreszenz (siehe Abbildung 39) ermittelte Induktion durch BaP in Caco-2-Zellen. Auch der zuvor bewiesene, reduzierende Effekt der Flavonoide kann im Western Blot bestätigt werden.



a) γH2Ax Blot

b) γH2Ax Quantifizierung

Abbildung 40: Nachweis von Flavonoideffekten auf die BaP-induzierte Erhöhung des γH2Ax-Spiegels in Caco-2-Zellen.

a) repräsentativer Western-Blot (n = 3) b) Quantifizierung des γH2Ax, normiert auf β-Actin. Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μM BaP und je 10 μM Flavonoid exponiert bzw. ko-exponiert. M, Proteingrößen-marker; Kon, Kontrolle; B, BaP, BG, BaP+Galangin, BQ, BaP+Quercetin, BM, BaP+Myricetin, BK, BaP+Kaempferol.

6.3.2 Flavonoideffekte auf die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen

Es konnte in 6.3.1 gezeigt werden, dass Flavonoide die BaP-induzierte Ausbildung von DNA-Strangbrüchen reduzieren können. Deshalb soll nun überprüft werden, ob Flavonoide auch vergleichbare Effekte auf die BaP-medierte Apoptose in Caco-2-Zellen hervorrufen. Hierzu wurden zunächst FACS-Analysen durchgeführt. Anschließend wurde der mRNA-Spiegel und die Proteinexpression bekannter Apoptosemarker wie NfκB und p73 sowie Bax und Bcl-2 mittels Real-Time-PCR bzw. Western-Blot-Analyse untersucht.

Zudem soll überprüft werden, ob Flavonoide die BaP-induzierte Steigerung der Caspase-3-Aktivität (Abbildung 19) modulieren können. Die Caco-2-Zellen wurden mit 3 μM BaP und 3 μM BaP in Kombination mit jeweils 10 μM Flavonoid für 24 h inkubiert bzw. ko-inkubiert. Als Kontrolle dienten mit 0,1 % DMSO behandelten Zellen. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

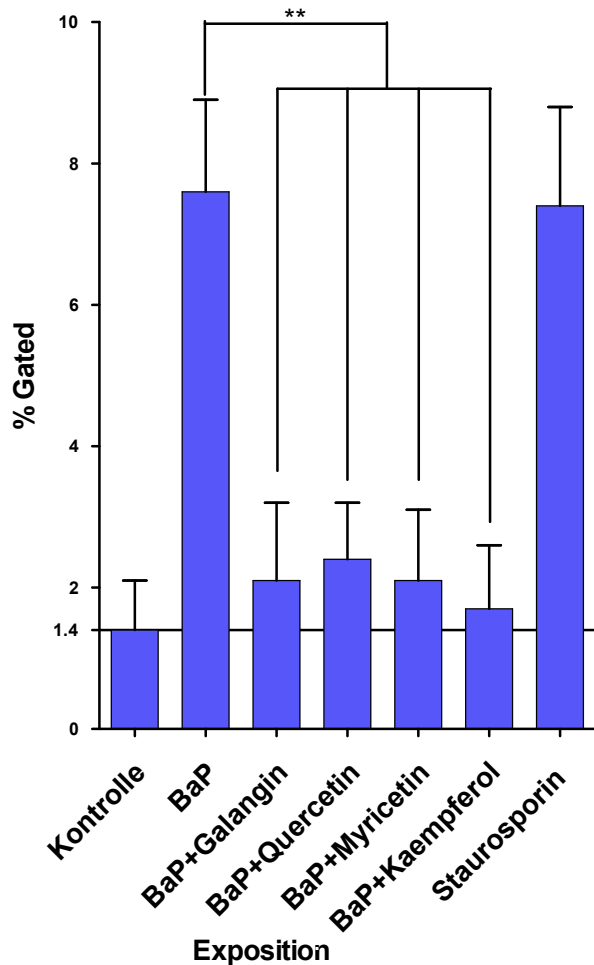


Abbildung 41: FACS-Analyse. Einfluss von Flavonoiden auf die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen.

Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle dienten mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen. (**, $p < 0,001$) ($n = 3$).

BaP steigert die Anzahl apoptotischer Zellen signifikant um das 4-fache in Caco-2-Zellen, wie bereits in (6.2.2) gezeigt wurde. Alle eingesetzten Flavonoide unterdrücken die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen signifikant um bis zu 95 % (BK) ($p < 0,001$).

Nachweis von BaP-Flavonoid-Kombinations-Effekten auf die Expression von Apoptosemarkern in Caco-2-Zellen

Es konnte keine (NF κ B/p73) bzw. eine nur marginale Bax (24 %), Bcl-2 (23 %) BaP-vermittelte Steigerung der mRNA-Level von Apoptosemarkern in Caco-2-Zellen nachgewiesen werden. Die Flavonoide Galangin und Quercetin zeigen in Kombination mit BaP auch keinerlei Effekte, jedoch unterdrücken die Kombinationen BaP–Myricetin (BM) und BaP–Kaempferol (BK) die mRNA-Spiegel aller untersuchten Apoptosemarker signifikant auf mindestens 50 % des Basal-Levels (Bax, BM) und

auf maximal 20 % des Basal-Levels (Bcl-2, BM) in Caco-2-Zellen. Auch bei p73 unterdrücken Myricetin und Kaempferol in Kombination mit BaP die Basal-Expression auf unter 50 %: p73 (BM: $p = 0,030$ // BK: $p = 0,023$), Bax (BM: $p = 0,041$ // BK: $p = 0,028$), Bcl-2 (BM: $p = 0,016$ // BK: $p = 0,029$). Die NF κ B-mRNA wird nur durch die BaP–Kaempferol-Kombination signifikant unterdrückt ($p = 0,013$).

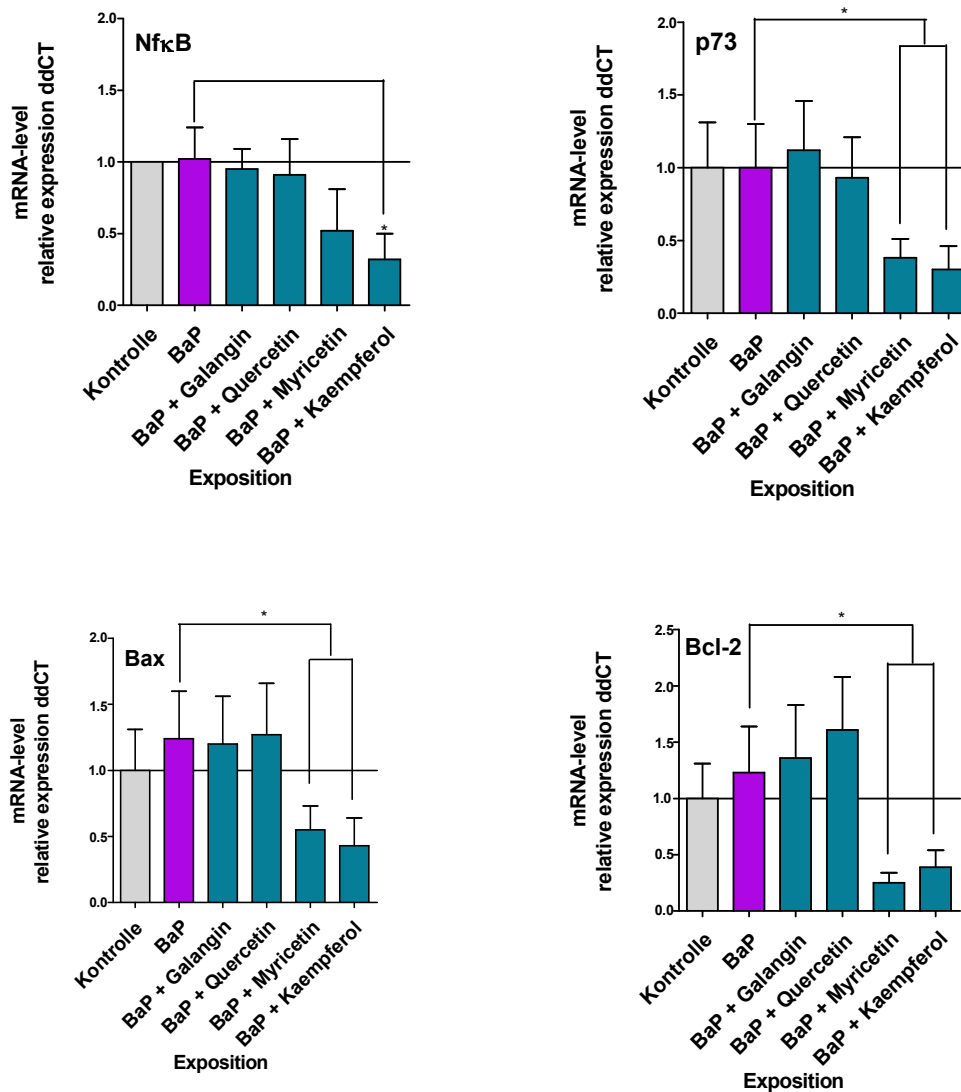


Abbildung 42: Einfluss von BaP-Flavonoid-Kombinations-Effekten des mRNA-Spiegels von Apoptosemarkern (NfκB, p73, Bax und Bcl-2) in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR). Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 3 μM BaP und jeweils 10 μM Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle dienten mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen. ($n = 3$), (*, $p < 0,05$) ($n = 3$)

Die Bax-Proteinexpression wird durch BaP in Caco-2-Zellen um 85 % gegenüber der Kontrolle induziert und kann durch alle eingesetzten Flavonoide um maximal 33 % (BQ & BK) reduziert werden. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 kann in Caco-2-Zellen nicht durch BaP induziert werden. Das Flavonoid Galangin zeigt alleine keine

Veränderung des Bcl-2 Protein-Spiegels (Abbildung 18) bewirkt aber Kombination mit BaP eine Verminderung um 58 % gegenüber der Kontrolle.

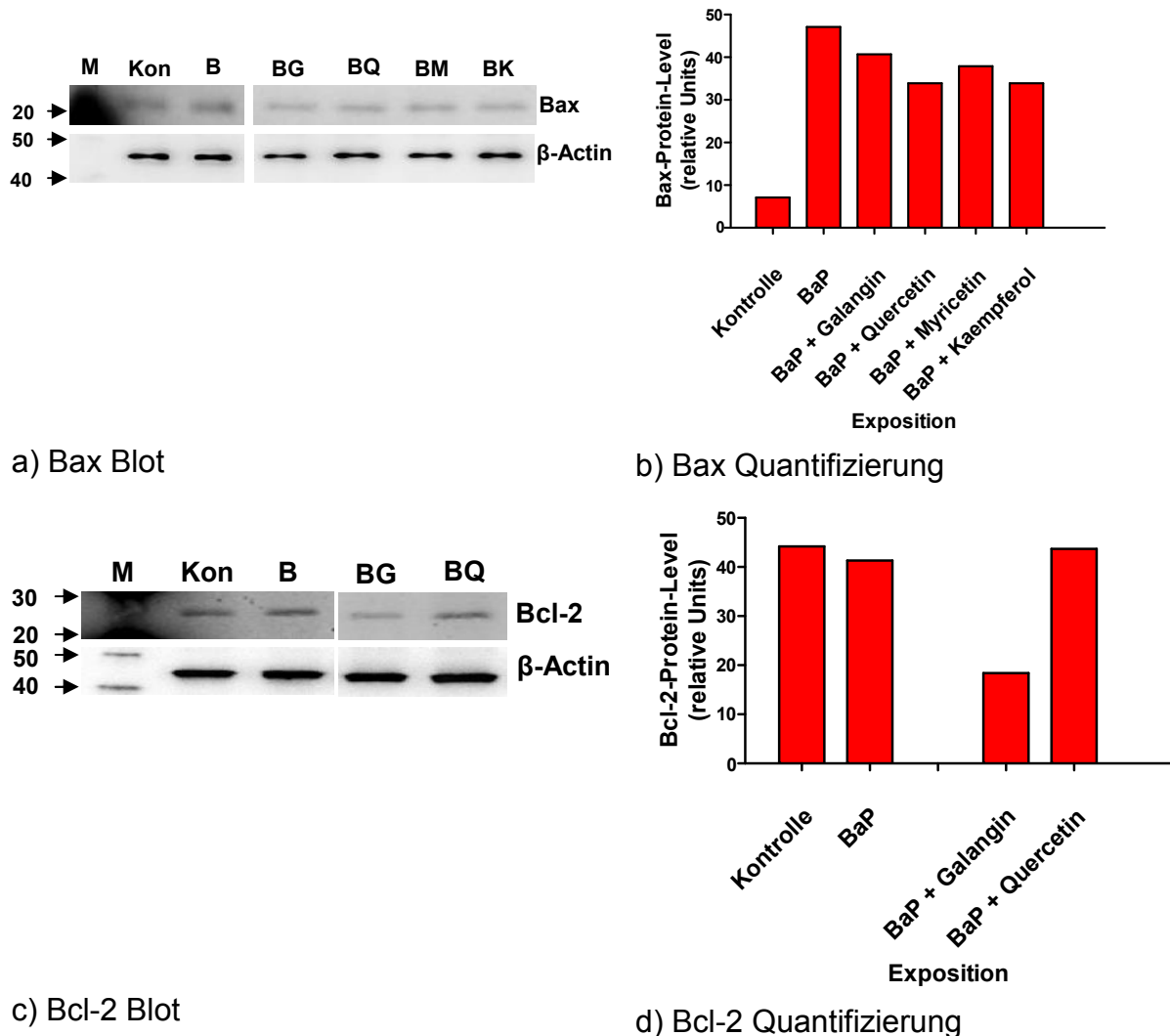


Abbildung 43: Nachweis von Flavonoideffekten auf BaP-medierte Induktionen auf Apoptosemarker in Caco-2-Zellen. a,c) repräsentative Western-Blots (n = 3) b,d) Quantifizierung der Apoptosemarker Bax und Bcl-2, über β -Actin Normierung. Die Zellen wurden 24 h mit der 0,1 % DMSO, 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M der Flavonoide Galangin und Quercetin inkubiert bzw. ko-inkubiert. M, Proteingrößen-marker; Kon, Kontrolle; B, BaP; BG, BaP+Galangin; BQ, BaP+Quercetin; BM, BaP+Myricetin; BK, BaP+Kaempferol.

Ermittlung des Effektes von Flavonoiden auf die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen über die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Wie bereits gezeigt wurde, steigert BaP zweifach die Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen. Zur Untersuchung von Flavonoideffekten auf die BaP-induzierte Caspase-3-Aktivierung wurden exemplarisch Quercetin und Galangin in einer Konzentration von 10 μ M verwendet. Caco-2-Zellen wurden mit 3 μ M BaP allein und gleichzeitig mit den Flavonoiden für 24 h exponiert. Quercetin senkt dabei die BaP-induzierte Steigerung der Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen signifikant um 60 % ab ($p = 0,007$). Die Absenkung durch Galangin um 30 % ist aufgrund der großen Streuung nicht signifikant.

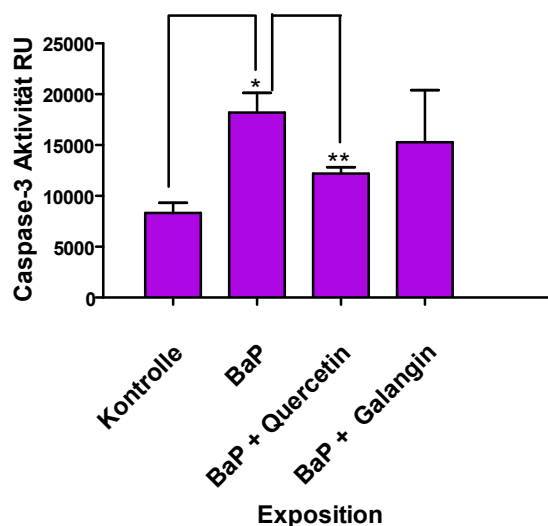


Abbildung 44: Einfluss von Flavonoiden auf BaP-medierte Effekte der Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen.

Die Caco-2-Zellen werden 24 h mit 0,1 % DMSO, 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid inkubiert bzw. ko-inkubiert. (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

6.3.3 Einfluss der BaP-Flavonoid-Kombinationseffekte auf den Zellzyklus in

Caco-2-Zellen

Nachdem Flavonoideffekte auf die BaP-medierte Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen festgestellt werden konnten, soll nun ermittelt werden, ob auch auf den Zellzyklus ein Einfluss der Flavonoide in Kombination mit BaP erfolgt. Mittels FACS-Analyse sollen Caco-2-Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus quantifiziert werden. Es soll überprüft werden, ob BaP in Kombination mit Flavonoiden den Ablauf

des Zellzyklus in Caco-2-Zellen verändert. Des Weiteren soll die Wirkung von BaP-Flavonoid-Kombinationen auf den mRNA-Spiegel Zellzyklus-relevanter Komponenten (p21, p27 und c-jun) mittels Real-Time-PCR ermittelt werden.

Eine BaP-vermittelte Proteininduktion des phosphorylierten Retinoblastoma-Proteins, ein Tumorsuppressor-Protein, konnte bereits nachgewiesen werden (Kapitel ****). Daher sollen mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot die Effekte der Flavonoide auf die BaP-induzierte Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins untersucht werden.

Die Caco-2-Zellen wurden mit 0,1 % DMSO, 3 μ M BaP und 3 μ M BaP in Kombination mit jeweils 10 μ M Flavonoid für 24 h inkubiert. Nocodazole wurde bei der FACS-Analyse als Positiv-Kontrolle für eine G2-Arretierung verwendet. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

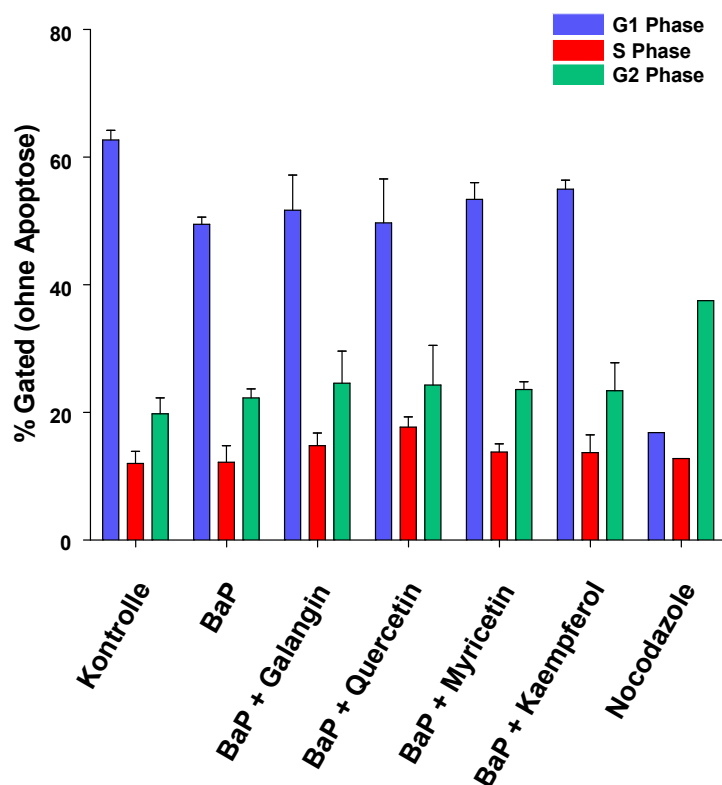


Abbildung 45: Einfluss von BaP-Flavonoidenkombinationen auf Zellzykluseffekte (FACS-Analyse).

Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle dienten mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen. (n = 3)

Eine BaP-Exposition führt in Caco-2-Zellen zu keiner Veränderung des Zellzyklus, wie bereits in (6.2.3) gezeigt wurde. Die Flavonoid-BaP-Kombinationen bewirken einen leichten G2-Shift. Der Anteil der sich in G1 befindenen Zellen sinkt ab und der

Anteil der Zellen in der S/G2- Phase steigt an. Die Flavonoide verhalten sich in BaP-Kombination alle gleich.

Einfluss von Flavonoid-BaP-Kombinationen die mRNA-Spiegel Zellzyklus-relevanter Komponenten in Caco-2-Zellen

Die mRNA-Spiegel von Zellzyklus-relevanten Komponenten (p21, p27 und c-jun) können durch die Kombination mit BaP und Flavonoiden in Caco-2-Zellen beeinflusst werden. Die Flavonoide Galangin und Quercetin steigern in Verbindung mit BaP die mRNA-Spiegel von p21 und c-jun. Myricetin und Kaempferol haben in Kombination mit BaP eher einen vermindernenden Effekt auf den mRNA-Level von Zellzyklus-relevanten Komponenten in Caco-2-Zellen. Signifikant nachzuweisen ist dieser Effekt nur bei p27. Hier vermindert Kaempferol die BaP-medierte Effekte signifikant auf ca. 50 % des Basal-Levels ($p = 0,047$).

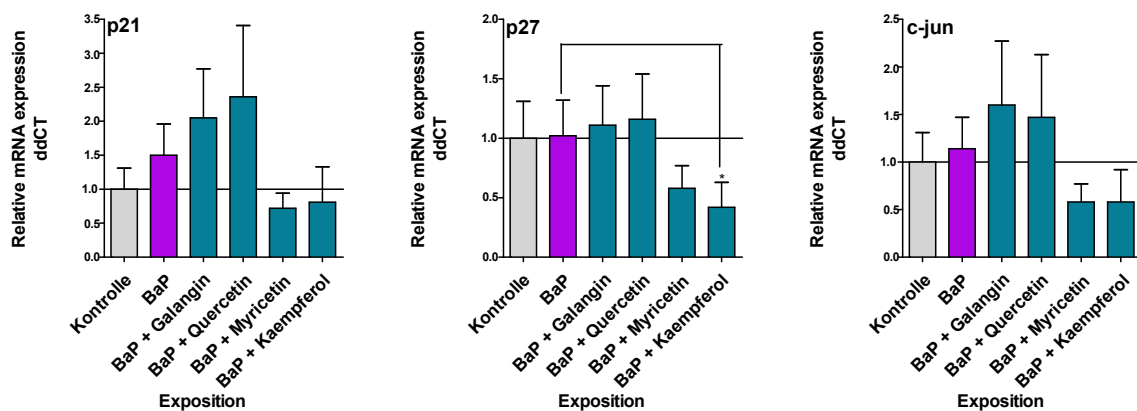


Abbildung 46: Einfluss von Flavonoiden auf BaP-medierte Veränderungen des mRNA Spiegels von Zellzyklus-relevanten Komponenten (p21, p27, c-jun) in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR). Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und 10 μ M Flavonoid koinkubiert. Als Kontrolle dienten mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen. (*, $p < 0,05$) ($n = 3$)

Flavonoideffekte auf die BaP-medierte Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins in Caco-2-Zellen

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz lässt sich zeigen, dass BaP die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (pRb) in Caco-2-Zellen induzieren kann. Quercetin in einer Konzentration von 10 μM kann diese durch 3 μM BaP induzierte Phosphorylierung offenbar verhindern (Abbildung 47).

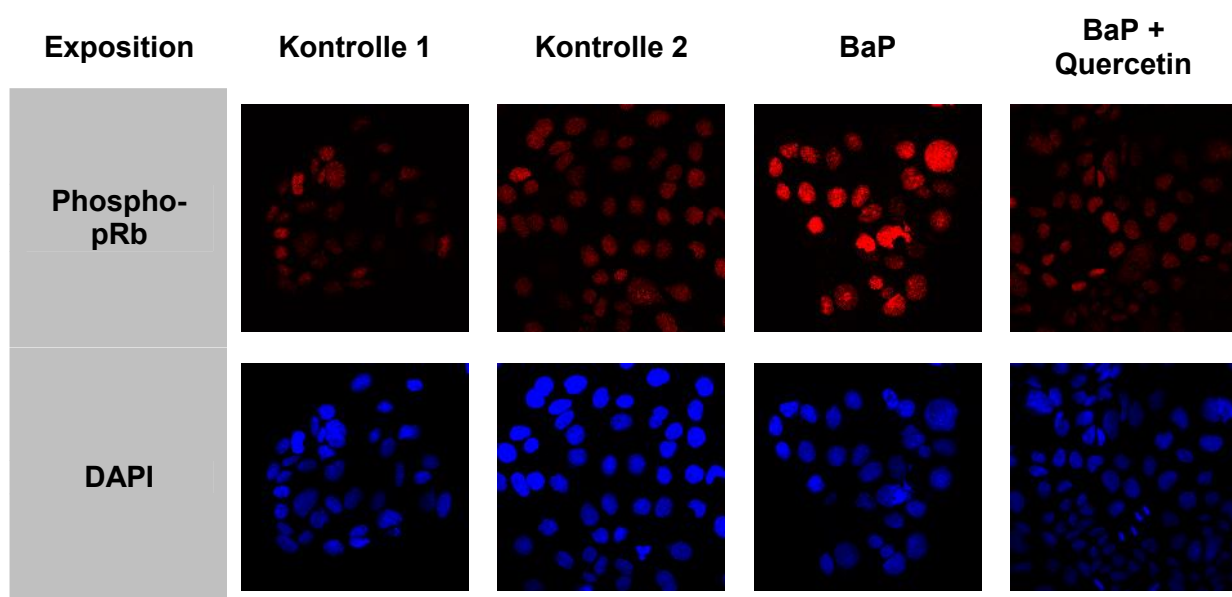
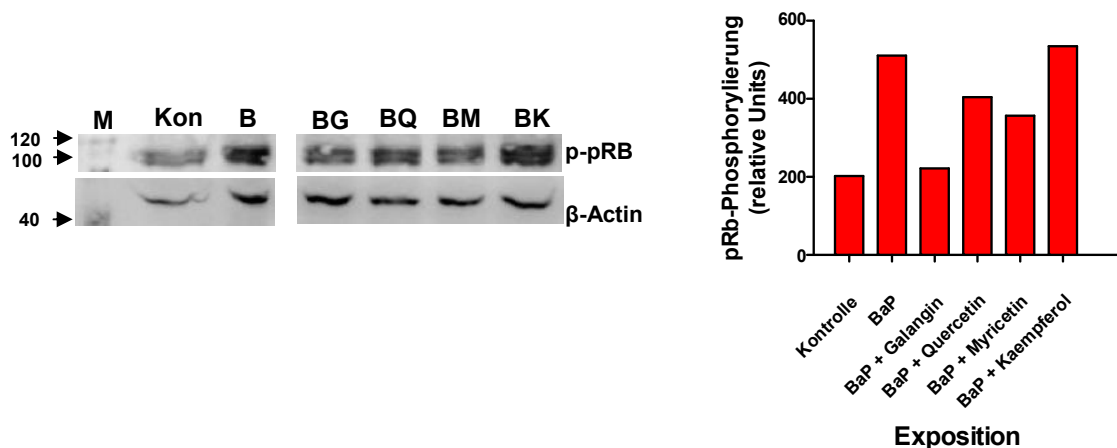


Abbildung 47: Ermittlung der Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen über Immunfluoreszenz.

Phosphoryliertes Rb-Protein wurde mit einem spezifischen C³-markierten Zweitantikörper markiert, die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μM BaP und 10 μM Quercetin ko-inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte (Kontrolle 1) und mit 0,1 % DMSO behandelte (Kontrolle 2) Zellen.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Experimente können durch Western-Blot-Analysen des phosphorylierten pRb in Caco-2-Zellen bestätigt werden. BaP induziert die Phosphorylierung des Rb-Proteins gegenüber der Kontrolle um 150 % in Caco-2-Zellen und Flavonoide können mit Ausnahme von Kaempferol diesem Effekt um mindestens 34 % (BQ) und maximal 94 % (BG) entgegen wirken.



a) Phospho-pRb Blot

b) pRb Quantifizierung

Abbildung 48: Nachweis von Flavonoideffekte auf die BaP vermittelte Phosphorylierung von pRb in Caco-2-Zellen.

a) repräsentativer Blot (n = 3) b) Quantifizierung der Western-Blot-Banden der pRb-Phosphorylierung über β-Actin Normierung. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO, 3 μM BaP und je 10 μM Flavonoid inkubiert bzw. ko-inkubiert. M, Proteingrößen-marker; Kon, Kontrolle; B, BaP, BG, BaP+Galangin, BQ, BaP+Quercetin, BM, BaP+Myricetin, BK, BaP+Kaempferol.

6.3.4 Effekte der BaP-Flavonoid-Kombinationen auf die Expression der Komponenten des AhR Signalweges in Caco-2-Zellen

Caco-2-Zellen wurden mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μM BaP sowie mit 3 μM BaP in Kombination mit jeweils 10 μM Flavonoid für 24 h inkubiert. Mit Real-Time-PCR und Western-Blot-Analysen wurden Transkript- bzw. Proteinspiegel der folgenden Komponenten semi-quantitativ bestimmt: AhR, AhRR, ARNT und AIP sowie CYP1A1 und CYP1B1 als Zielgene des AhR-Wegs.

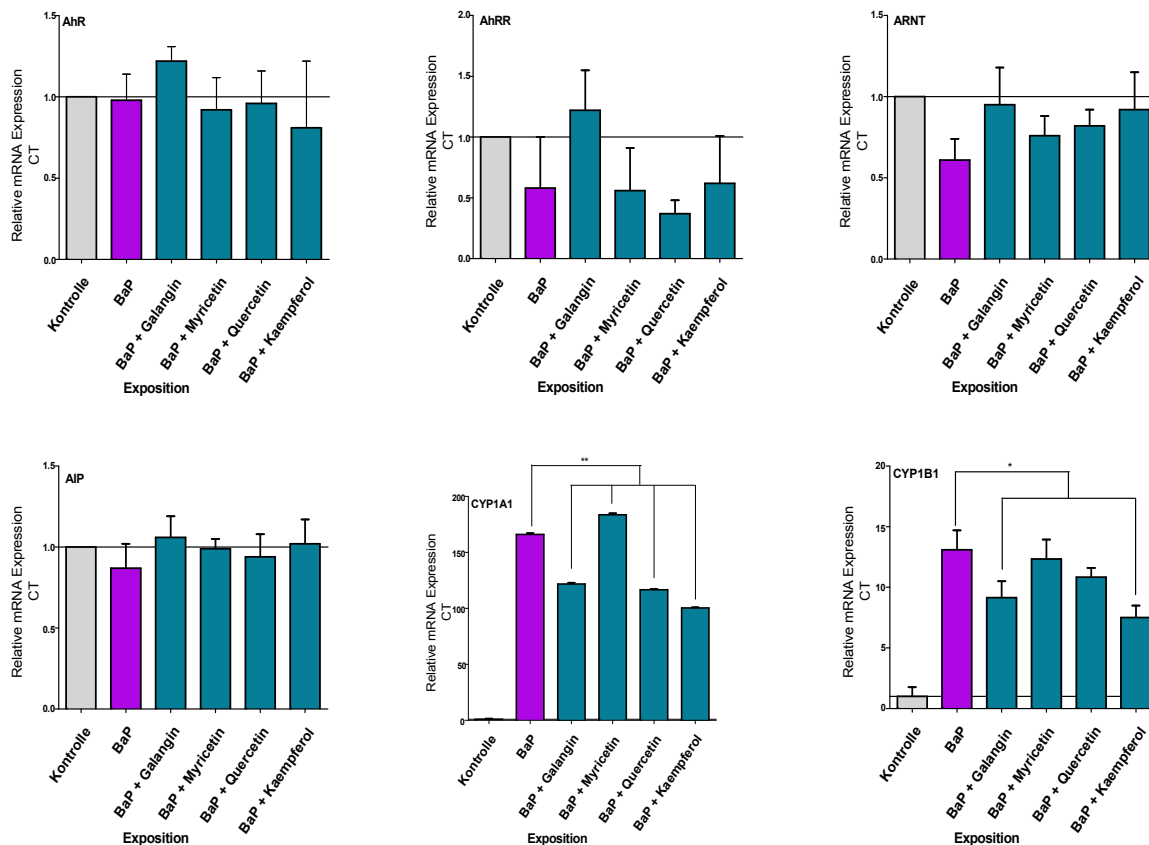


Abbildung 49: Einfluss von BaP-Flavonoidkombinationen auf den mRNA-Spiegel der AhR Signalweg-Komponenten AhR, AhRR, ARNT und AIP sowie den Zielgenen CYP1A1 und CYP1B1 in Caco-2-Zellen.

Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid ko-incubiert. Als Kontrolle dienen mit 0,1% DMSO behandelte Zellen. (*, $p < 0,05$ // **, $p < 0,001$) ($n = 3$). Die Transkriptspiegel wurden mittels Real-Time-PCR bestimmt.

Die mRNA-Spiegel von AhR, ARNT und AIP werden in Caco-2-Zellen durch BaP nicht beeinflusst und auch die Flavonoide zeigen in Kombination keinerlei Effekte. BaP senkt den AhRR mRNA-Spiegel ab und von den Flavonoiden kann nur Galangin diese Hemmung aufheben und ggf. sogar eine marginale Steigerung des AhRR mRNA-Spiegels gegenüber der Kontrolle zu bewirken. Die mRNA-Spiegel der CYP-Enzyme, CYP1A1 und CYP1B1, werden durch BaP stark induziert und zwar um den Faktor 100 bzw. 10. Mit Ausnahme von Myricetin senken Flavonoide die BaP-medierte Induktion ab, wobei sich die Abnahme bei CYP1A1 zwischen 27 % und 40 % bewegt, bei CYP1B1 zwischen 6 % und 43 %. Der BaP-induzierte CYP1A1 mRNA-Spiegel wird signifikant durch Galangin (27 %, $p < 0,001$), Quercetin (30 %, $p < 0,001$) und Kaempferol (40 %, $p < 0,001$) abgesenkt. Im Gegensatz hierzu steigert Myricetin die BaP-medierte Induktion der CYP1A1-mRNA in Caco-2-Zellen leicht aber signifikant (10 %, $p < 0,001$). Für den CYP1B1 mRNA-Level bietet sich nahezu

das gleiche Bild. Hier ist die Beeinflussung des BaP-Effektes jedoch nur für die entgegenwirkende Reaktion der Flavonoide Galangin (30 %, $p = 0,030$) und Kaempferol (43 %, $p = 0,007$) signifikant.

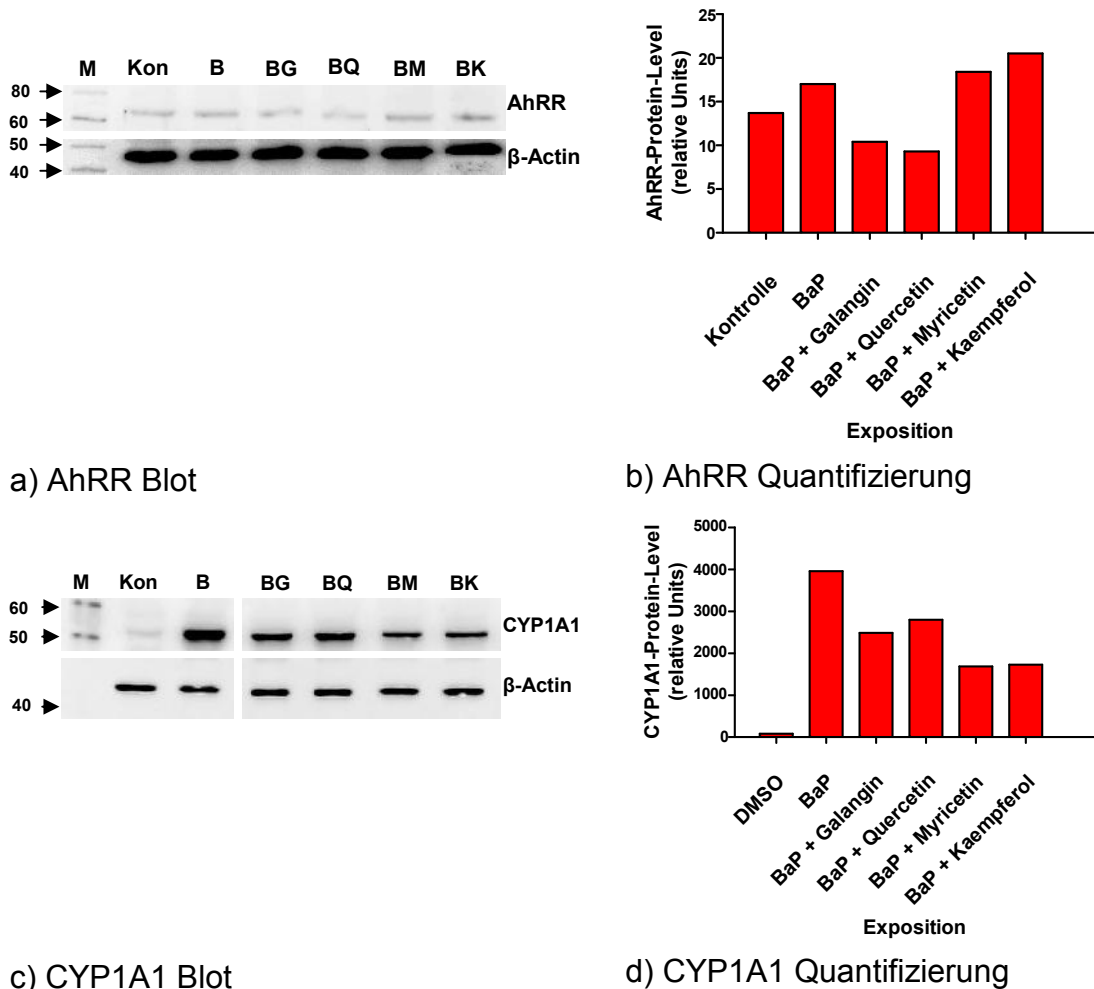


Abbildung 50: Effekt von BaP-Flavonoid-Kombinationen auf die Proteininduktion der AhR-Signalwegskomponente AhRR und des AhR Zielgens CYP1A1 in Caco-2-Zellen. a,c) repräsentative Blots ($n = 3$). b,d) Quantifizierung der Western-Blot-Banden von AhRR und CYP1A1, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. M, Proteingrößenmarker; Kon, Kontrolle; B, BaP; BG, BaP+Galangin; BQ, BaP+Quercetin; BM, BaP+Myricetin; BK, BaP+Kaempferol.

Das AhR-Repressor-Protein (AhRR) wird in Caco-2-Zellen marginal durch BaP induziert. Die Flavonoide Galangin und Quercetin verhindern den BaP-Effekt und unterdrücken darüberhinaus noch die Basalexpression, wohingegen die Flavonoide Myricetin und Kaempferol die BaP-vermittelte Induktion des AhRR in Caco-2-Zellen nicht verändern oder ggf. leicht steigern.

Das BaP-metabolisierende Enzym CYP1A1 wird, wie bereits gezeigt wurde (Abbildung 27), in Caco-2-Zellen deutlich durch BaP induziert. Alle eingesetzten

Flavonoide können die BaP-medierte CYP1A1-Induktion um bis zu 58 % (BM) in Caco-2-Zellen reduzieren (Abbildung 50).

6.3.5 Einfluss von Flavonoiden auf die BaP-induzierte CYP1A1-abhängige

Enzymaktivität (EROD) in Caco-2-Zellen

Der Einfluss von BaP und Flavonoiden auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen konnte bereits in Abbildung 28 gezeigt werden. BaP steigert die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen signifikant, aber auch die Flavonoide steigern diese in unterschiedlicher Stärke. Da in 6.3.4 der Effekt der Flavonoide auf die BaP-medierte Veränderungen der Expression der AhR-Signalwegskomponenten besonders beim CYP1A1 gezeigt werden konnten, stellt sich nun die Frage, ob die Flavonoide auch die BaP-induzierte Steigerung der CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen beeinflussen können. Hierfür wird ein Ethoxyresorufin-O-deethylase-Assay (EROD) durchgeführt. Für alle Versuche werden die Caco-2-Zellen 24 h mit 3 μ M BaP und 10 μ M Flavonoid inkubiert, bzw. ko-inkubiert. Zusätzlich werden die Zellen mit 0,1 % DMSO für 24 h als Kontrolle behandelt.

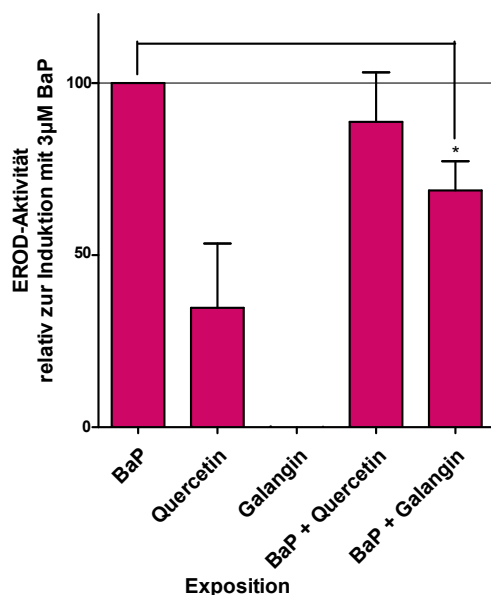


Abbildung 51: Effekte von Flavonoiden auf die Induktion der CYP1A1-abhängigen EROD-Aktivität durch BaP in Caco-2-Zellen.

Die CYP1A1 Aktivität wurde durch eine 24 h Inkubation mit 3 μ M BaP induziert, 10 μ M Galangin und 10 μ M Quercetin wurden einzeln als Kontrolle für 24 h inkubiert und ko-inkubiert. Die BaP-induzierte CYP1A1-Aktivität wurde zum Vergleich auf 100 % gesetzt, dies entspricht im Mittel einer Aktivität von 5 pMol Resorufin/(mg Protein * min). (*, $p < 0,05$) (n = 3)

Quercetin erreicht allein ca. 40 % der BaP-vermittelten EROD-Aktivität, während Galangin im Vergleich zu BaP und Quercetin keinen alleinigen Einfluss auf die EROD-Aktivität besitzt (Abbildung 51).

Das Flavonoid Galangin verhindert die BaP-induzierte Steigerung der CYP1A1-Aktivität signifikant um 30 % ($p = 0,003$). Quercetin hat nur einen marginal absenkenden Effekt auf die BaP-mediierte CYP1A1 Aktivität.

6.3.6 Einfluss von Flavonoiden auf die BaP-mediierten Effekten auf die MAPK-, AKT- und Nrf2-Signalwege in Caco-2-Zellen entgegenwirken?

Die entgegenwirkenden Flavonoideffekte auf BaP-mediierte Veränderungen des mRNA Spiegels mancher AhR-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen konnte in 6.3.4 gezeigt werden. Dadurch stellt sich nun die Frage, ob Flavonoide auch die BaP-vermittelten Effekte auf andere Signalwege der Caco-2-Zellen beeinflussen können. Die Transkript-Spiegel folgender Signalwegskomponenten wurden mittels Real-Time-PCR ermittelt: JNK, p38 und ERK für die MAPK Signalwege (Abbildung 52), AKT, PI3K und PTEN für den AKT Signalweg (Abbildung 56) sowie Nrf2 und keap1 für den Nrf2 Signalweg mit GSTA1 als Zielgen des Wegs (Abbildung 60).

Zur Ermittlung des Protein-Spiegels wurden die MAP-Kinasen JNK, p38 und ERK inklusive ihrer phosphorylierten Formen (Abbildung 53, Abbildung 54 & Abbildung 55) sowie AKT, PI3K, das Zielprotein GSK-3 (Abbildung 57, Abbildung 58 & Abbildung 59) und beim Nrf2-Weg Nrf2 selbst sowie das Zielprotein GSTP1 (Abbildung 61 & Abbildung 62) mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Für alle Versuche werden die Caco-2-Zellen 24 h mit 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle dienten mit 0,1% DMSO behandelte Zellen. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Einfluss von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die Expression der **MAPK**-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen

In Abbildung 52 zeigt sich, dass von den eingesetzten Flavonoiden offenbar einzig Galangin signifikant die BaP-mediierten Hemmungen auf den mRNA-Spiegel der untersuchten MAPK, JNK ($p = 0,013$) und ERK ($p = 0,038$), in Caco-2-Zellen

aufheben kann. Galangin steigert bereits selbst den mRNA-Spiegel der JNK signifikant um bis zu 23 % gegenüber der Kontrolle (Bei p38 und ERK sind keine Veränderungen der Einzel-Flavonoid-Reaktion gegenüber der BaP-Kombination sichtbar).

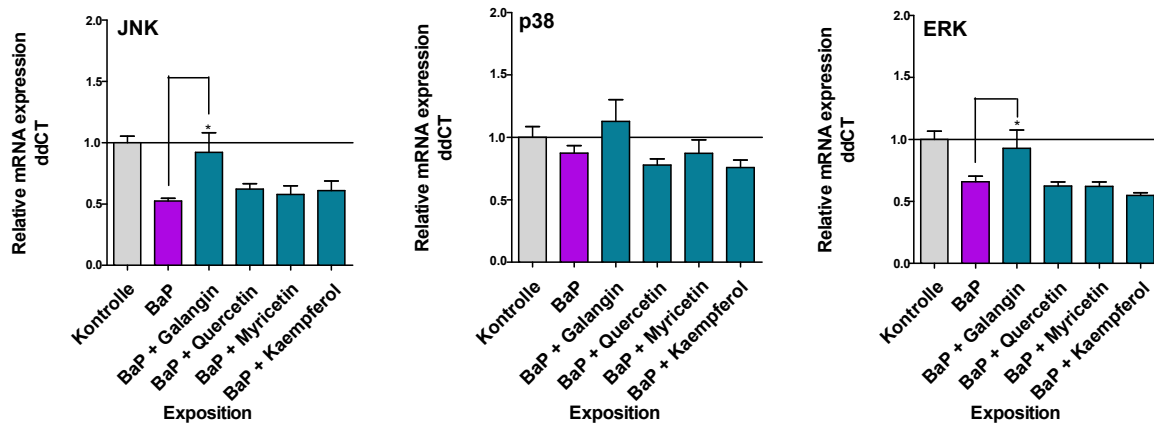
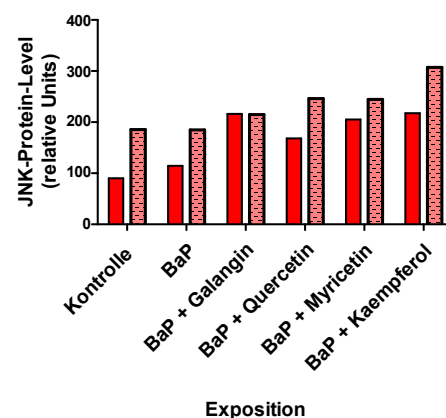
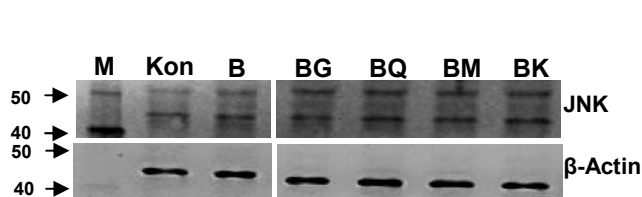


Abbildung 52: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf den mRNA-Spiegel der MAPK in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.

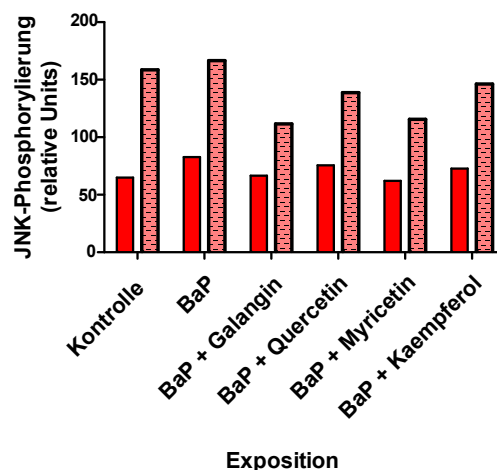
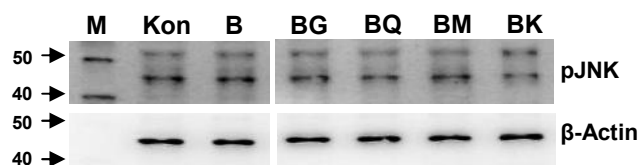
Die Zellen wurden 24 h mit der Kontrolle (0,1 % DMSO), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. (*, $p < 0,05$) ($n = 3$)

Die durch BaP hervorgerufene Erniedrigung des JNK-mRNA-Spiegels (siehe Abbildung 52) spiegelt sich nicht im Protein-Level der JNK wieder. Weder BaP noch die BaP-Flavonoid-Kombinationen zeigen einen Effekt auf den JNK-Protein-Level oder deren Phosphorylierung (Abbildung 53).



a) JNK Blots

b) JNK Quantifizierung



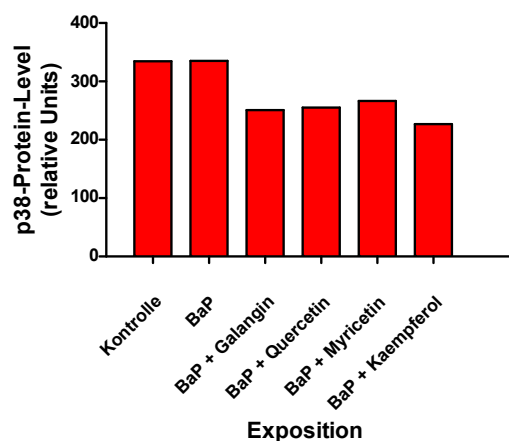
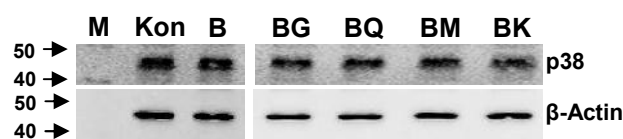
c) pJNK Blots

d) pJNK Quantifizierung

Abbildung 53: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die JNK und deren Phosphorylierung in Caco-2-Zellen.

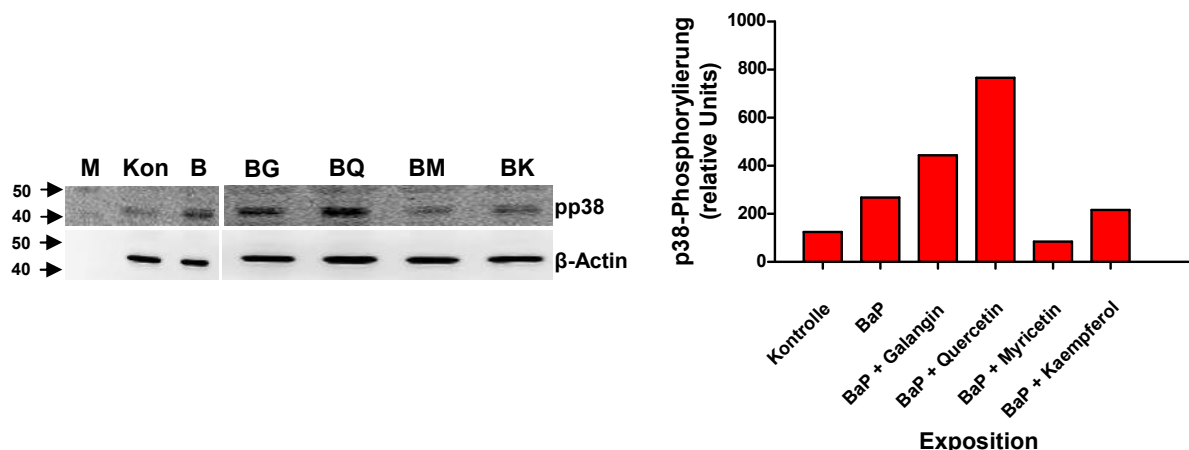
a,c) repräsentative Western-Blots (n = 3). b,d) Quantifizierung der Western-Blot-Banden JNK und Phospho-JNK, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet. M, Proteingrößenmarker; Kon, Kontrolle; B, BaP; BG, BaP+Galangin; BQ, BaP+Quercetin; BM, BaP+Myricetin; BK, BaP+Kaempferol.

BaP und die Flavonoide alleine (Abbildung 31) bewirken keine Erhöhung des p38-Protein-Spiegels in Caco-2-Zellen. Jedoch zeigen die Flavonoide in Kombination mit BaP einen hemmenden Effekt auf den basalen p38-Protein-Spiegel in Caco-2-Zellen um maximal 30 % (Abbildung 54).



a) p38 Blot

b) p38 Quantifizierung



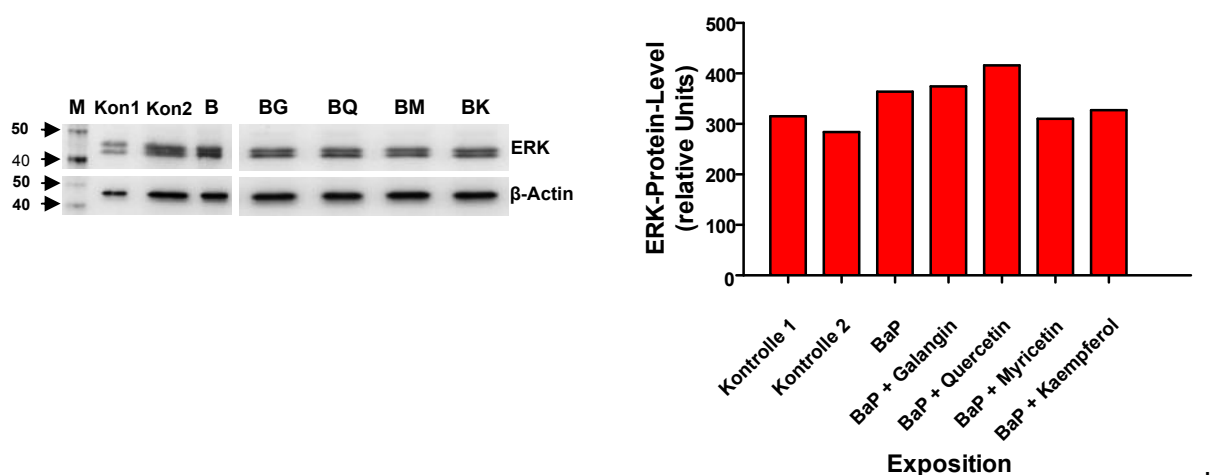
c) pp38 Blot

d) pp38 Quantifizierung

Abbildung 54: Effekte von Flavonoid-BaP-Kombinationen auf p38 und deren Phosphorylierung in Caco-2-Zellen.

a,c) repräsentative Western-Blots (n = 3). b,d) Quantifizierung der Western-Blot-Banden p38 und phospho-p38, normiert auf β-Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μM BaP und je 10 μM Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet. M, Proteingrößen-marker; Kon, Kontrolle; B, BaP, BG, BaP+Galangin, BQ, BaP+Quercetin, BM, BaP+Myricetin, BK, BaP+Kaempferol.

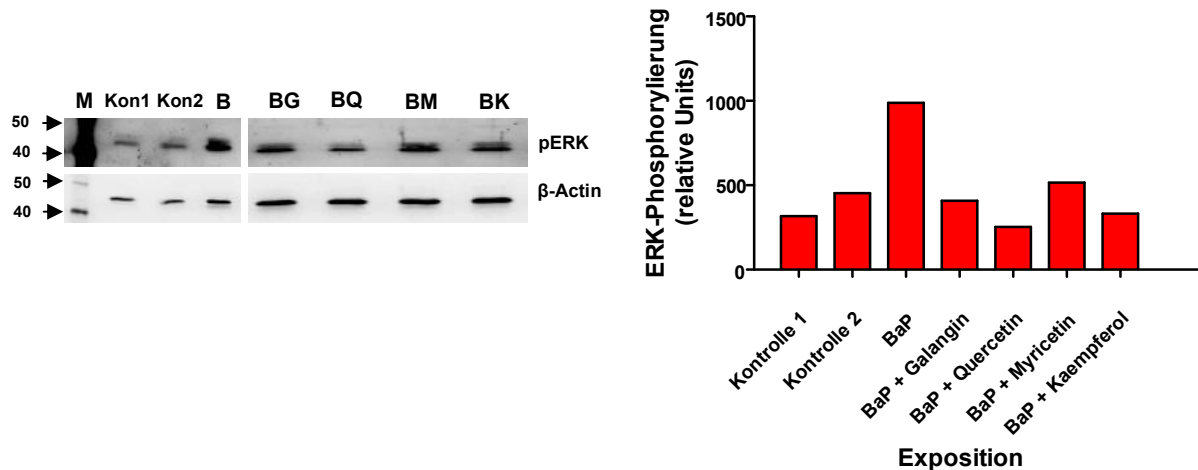
Der Spiegel an phosphoryliertem p38 kann durch BaP in Caco-2-Zellen gegenüber der Kontrolle verdoppelt werden, während die Flavonoide alleine mit Ausnahme von Kaempferol keinen Effekt hervorrufen (Abbildung 31). In Kombination mit BaP zeigen Flavonoide sehr unterschiedliche Effekte auf die Phosphorylierung der p38-MAPK. Galangin und Quercetin steigern deutlich um 122 % bzw. 350 % die BaP-vermittelte p38-Phosphorylierung, während Myricetin diesen komplett aufhebt und darüber hinaus den Basalspiegel um 30 % senkt und Kaempferol den Induktions-Effekt von BaP um 36 % aufhebt (Abbildung 54).



a) ERK Blot

b) ERK Quantifizierung

b



c) pERK Blot

d) pERK Quantifizierung

Abbildung 55: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf ERK und deren Phosphorylierung in Caco-2-Zellen.

a,c) repräsentative Western-Blot-Analyse. b,d) Quantifizierung der Western-Blot-Banden ERK und Phospho-ERK, normiert auf β-Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μM BaP und je 10 μM Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet. M, Proteingrößenmarker; Kon, Kontrolle; B, BaP; BG, BaP+Galangin; BQ, BaP+Quercetin; BM, BaP+Myricetin; BK, BaP+Kaempferol.

Der Protein-Spiegel von ERK wird weder durch BaP-Exposition noch durch die Flavonoide beeinflusst (Abbildung 32). BaP erhöht jedoch den Level der phosphorylierten ERK in Caco-2-Zellen auf ca. das 2-fache. Alle eingesetzten Flavonoide, nämlich Galangin, Quercetin, Myricetin und Kaempferol können die BaP-vermittelte ERK-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen komplett blockieren (Abbildung 55).

Einfluss von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die Expression der **AKT**-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen?

Der mRNA-Spiegel von AKT wird in Caco-2-Zellen weder durch BaP noch durch die Flavonoide beeinflusst. Dem gegenüber wird der PTEN mRNA-Spiegel durch BaP-Exposition sowie auch durch Quercetin und Kaempferol unterdrückt (Abbildung 33). Beide Flavonoide führen in Kombination mit BaP zu einer weiteren signifikanten Absenkung (Q, $p = 0,034$ // G, $p = 0,009$), während Galangin den BaP-Effekt signifikant aufhebt ($p = 0,018$), alleine aber keinen Effekt hat. Auch der PI3K mRNA-Level wird in Caco-2-Zellen durch BaP und Flavonoide moduliert. Anders als bei PTEN bewirkt BaP hier eine Induktion, die signifikant in Kombination mit den Flavonoiden Myricetin ($p < 0,001$) und Kaempferol ($p < 0,001$) um 40 % abgesenkt

wird (Abbildung 56), obwohl beide Flavonoide alleine - wie schon gezeigt - den PI3K-mRNA-Level um ca. 200 % gegenüber der Kontrolle steigern (Abbildung 33).

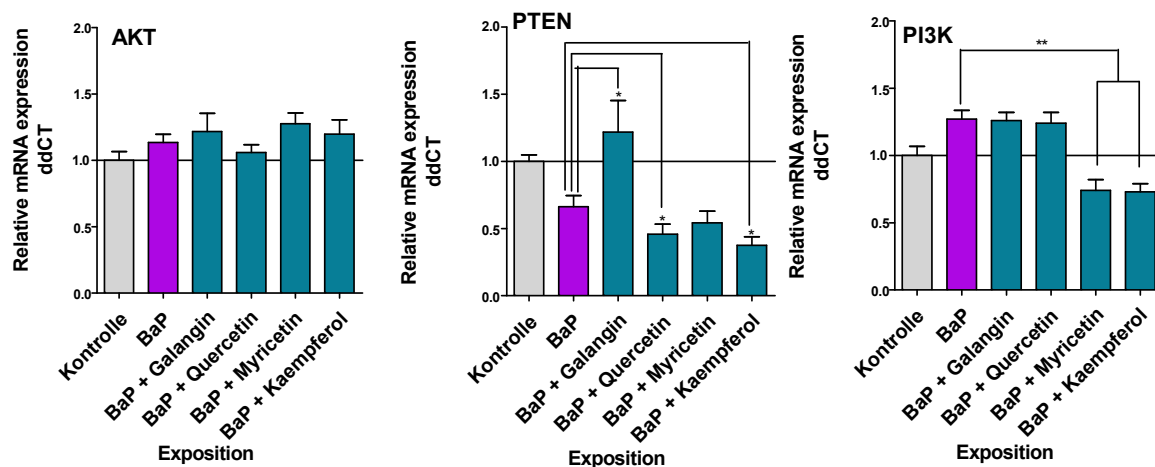
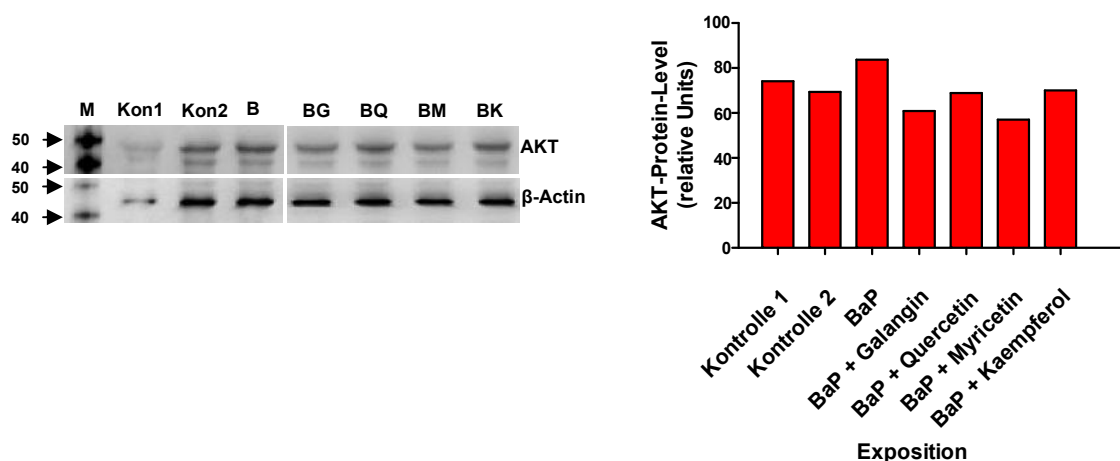


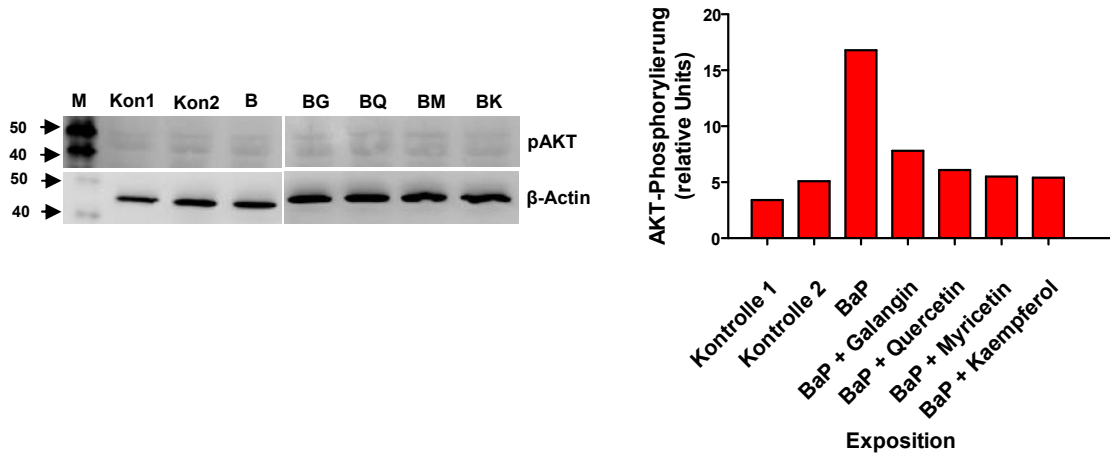
Abbildung 56: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf den mRNA-Spiegel der AKT-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet. (*, $p < 0,05$ // **, $p < 0,01$) ($n = 3$).

Der AKT-Proteinlevel wird weder durch BaP, noch in Kombination mit Flavonoiden in Caco-2-Zellen beeinflusst (Abbildung 57).



a) AKT Blot

b) AKT Quantifizierung



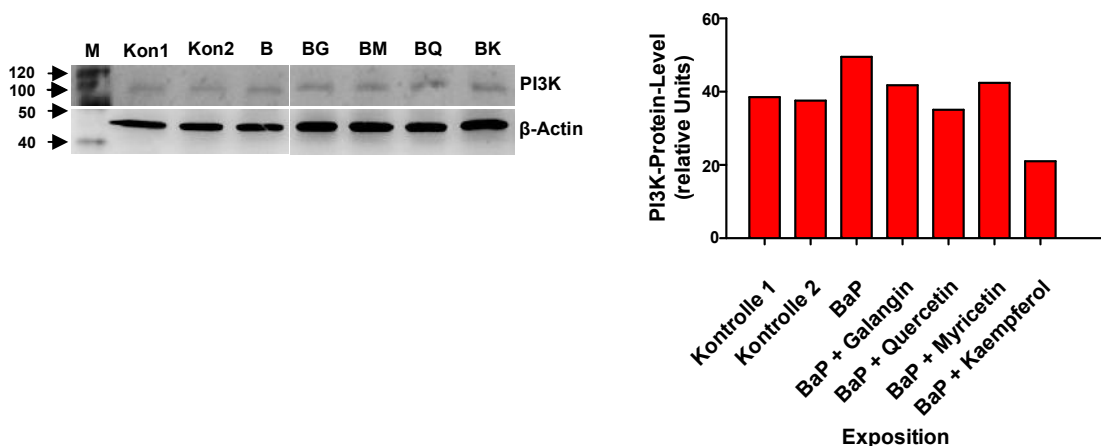
c) pAKT Blot

d) pAKT Quantifizierung

Abbildung 57: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die AKT-Protein-induktion und deren Phosphorylierung in Caco-2-Zellen.

a,c) repräsentative Western-Blots (n = 3). b,d) Quantifizierung der Western-Blot-Banden AKT und phospho-AKT, normiert auf β-Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μM BaP und je 10 μM Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte (1) und mit 0,1 % DMSO behandelte (2) Zellen verwendet. M, Proteingrößen-marker; Kon, Kontrolle; B, BaP: BG, BaP+Galangin; BQ, BaP+Quercetin; BM, BaP+Myricetin; BK, BaP+Kaempferol.

BaP induziert jedoch stark die Phosphorylierung von AKT. Alle eingesetzten Flavonoide haben einzeln keinen Effekt auf die AKT-Phosphorylierung (Abbildung 34), können aber der BaP-vermittelten Induktion der AKT-Phosphorylierung deutlich entgegen wirken, so dass der Phosphorylierungsgrad fast auf dem Niveau der Kontrolle bleibt (Abbildung 57).



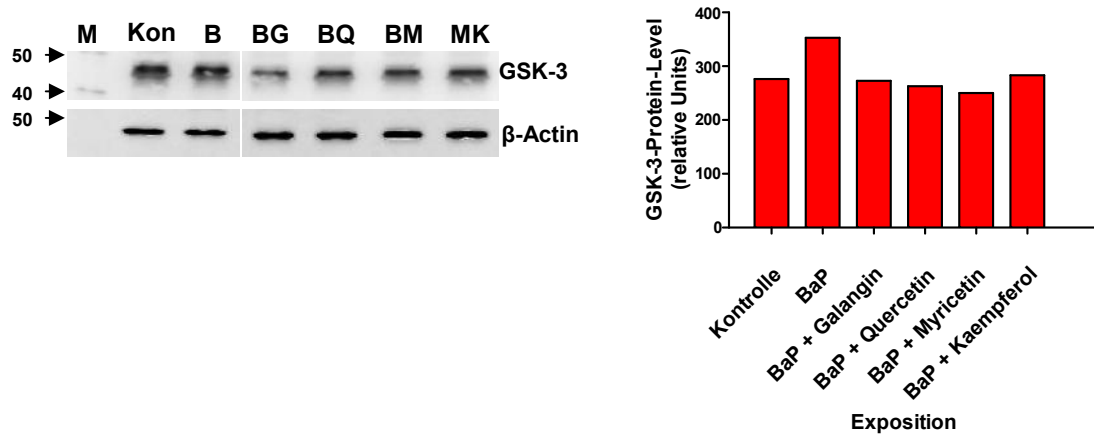
a) PI3K

b) PI3K

Abbildung 58: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die PI3K-Protein-induktion in Caco-2-Zellen.

a) repräsentativer Western-Blot (n = 3). b) Quantifizierung der Western-Blot-Banden von PI3K normiert auf β-Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μM BaP und je 10 μM Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte (Kon1) und mit 0,1 % DMSO behandelte (Kon2) Zellen verwendet. M, Proteingrößen-marker; Kon, Kontrolle; B, BaP: BG, BaP+Galangin; BQ, BaP+Quercetin; BM, BaP+Myricetin; BK, BaP+Kaempferol.

Die Protein-Spiegel der PI3K (Abbildung 58) und der GSK-3 (Abbildung 59) werden weder durch BaP noch durch die BaP-Flavonoid-Kombinationen moduliert. Einzig die Kombination von BaP mit Kaempferol bewirkt offenbar eine Suppression des PI3K-Protein-Spiegels, obwohl die Flavonoide selbst keine Veränderungen hervorrufen (Abbildung 34).



a) GSK-3

b) GSK-3

Abbildung 59: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die GSK-3-Protein-induktion in Caco-2-Zellen.

a) repräsentativer Western-Blot (n = 3). b) Quantifizierung der Western-Blot-Banden GSK-3, normiert auf β-Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μM BaP und je 10 μM Flavonoid koinkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte (1) und mit 0,1 % DMSO behandelte (2) Zellen verwendet. M, Proteingrößen-marker; Kon, Kontrolle; B, BaP; BG, BaP+Galangin; BQ, BaP+Quercetin; BM, BaP+Myricetin; BK, BaP+Kaempferol.

Einfluss von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die Expression der **Nrf2**-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen?

BaP hat, wie in Abbildung 60 dargestellt, kaum einen Effekt auf die mRNA-Spiegel der Nrf2-Signalwegskomponenten und Zielgene Nrf2, keap1, GSTP1 und GCS in Caco-2-Zellen und auch die Flavonoide zeigen keine signifikanten Einflüsse. BaP hat einen leicht senkenden Effekt auf den GSTA1 mRNA-Spiegel in Caco-2-Zellen. Galangin ($p < 0,001$) und Kaempferol ($p = 0,003$) bewirken in Kombination mit BaP eine deutliche um fast 600 (BG) bzw 700 % (BK) Erhöhung des GSTA1-mRNA-Spiegels. Der steigernde Effekt von BaP auf den mRNA-Spiegel von NQO1 in Caco-2-Zellen kann nur durch Myricetin ($p = 0,038$) noch signifikant gesteigert werden.

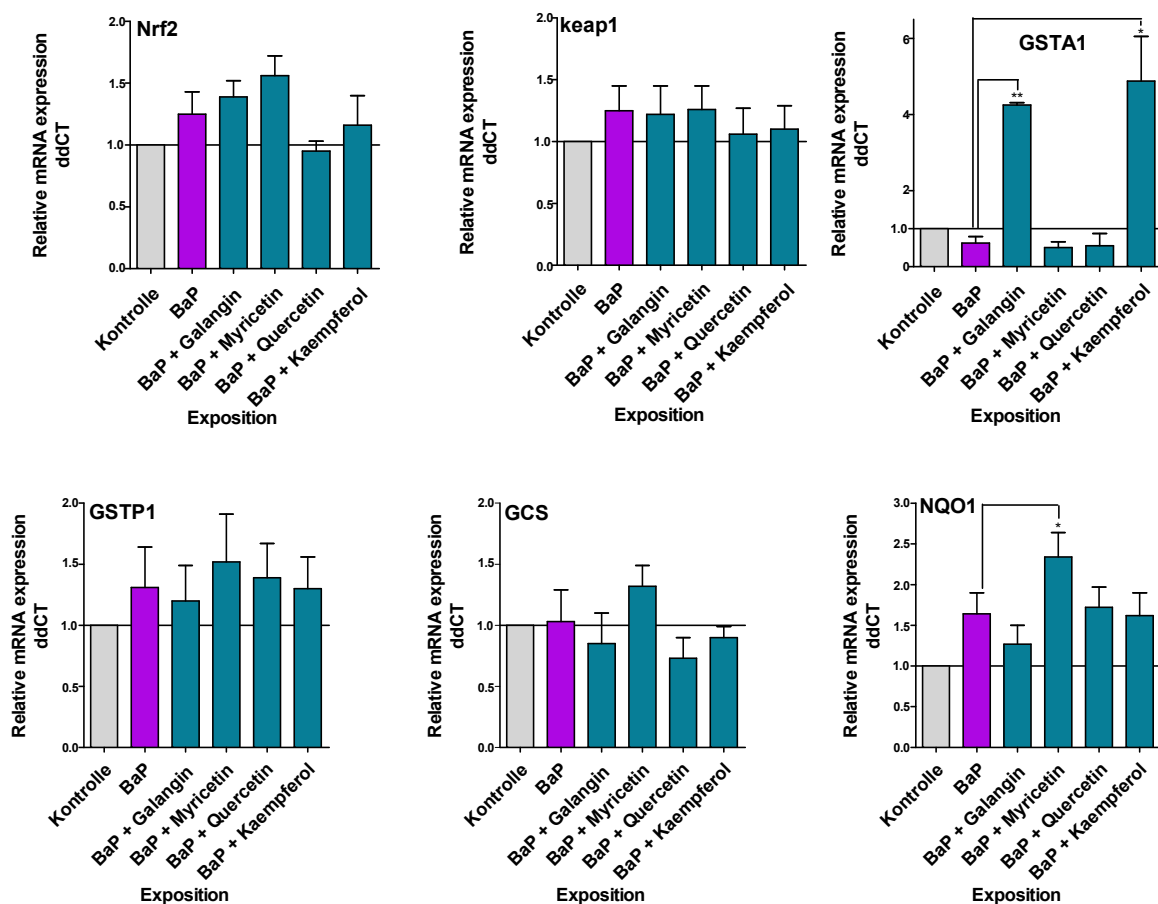
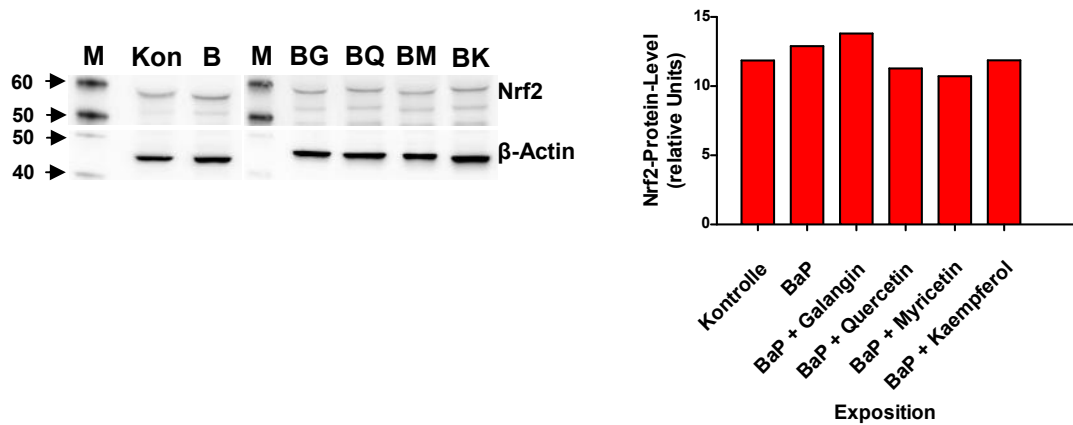


Abbildung 60: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf den mRNA-Spiegel der Nrf2-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.

Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet. (n = 3)



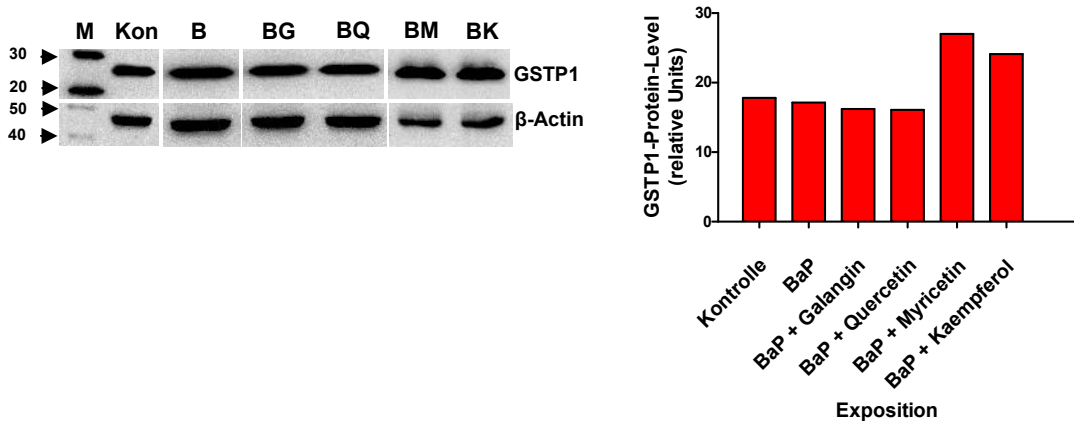
a) Nrf2

b) Nrf2

Abbildung 61: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die Nrf2-Protein-induktion in Caco-2-Zellen.

a) repräsentativer Western-Blot. b) Quantifizierung der Western-Blot-Banden Nrf2, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet. M, Proteingrößen-marker; Kon, Kontrolle; B, BaP, BG, BaP+Galangin, BQ, BaP+Quercetin, BM, BaP+Myricetin, BK, BaP+Kaempferol.

Der Protein-Level von Nrf2 in Caco-2-Zellen wird weder durch BaP noch durch die eingesetzten Flavonoide beeinflusst (Abbildung 61).



a) GSTP1

b) GSTP1

Abbildung 62: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die GSTP1-Protein-induktion in Caco-2-Zellen.

a) repräsentativer Western-Blot. b) Quantifizierung der Western-Blot-Banden GSTP1, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet. M, Proteingrößen-marker; Kon, Kontrolle; B, BaP, BG, BaP+Galangin, BQ, BaP+Quercetin, BM, BaP+Myricetin, BK, BaP+Kaempferol.

Der Protein-Level von GSTP1 wird in Caco-2-Zellen wird weder durch BaP noch durch die eingesetzten Flavonoide beeinflusst, lediglich Myricetin und Kaempferol

scheinen die Induktion von GSTP1 in Kombination mit BaP leicht zu erhöhen (Abbildung 62).

6.4 Abhängigkeit der BaP- und Flavonoideffekte in Caco-2-Zellen vom Arylhydrokarbon-Rezeptor-(AhR)-Signalweg

In Teil 6.2 und 6.3 konnte gezeigt werden, dass BaP und Flavonoide Effekte in Caco-2-Zellen hervorrufen und dass Flavonoide in der Lage sind BaP-mediierte Effekte in Caco-2-Zellen teilweise zu beeinflussen. In diesem Teil soll nun geklärt werden, ob die ermittelten Effekte abhängig vom AhR-Signalweg sind. Hierfür wird ein AhR-Inhibitor, 3-Methoxy-4-nitroflavon (MNF), verwendet, der als Antagonist direkt an den AhR bindet. Durch die Inhibition des AhR mittels MNF wird die Transkription der AhR Zielgene, wie die des BaP-metabolisierenden Enzyms CYP1A1, unterbunden.

6.4.1 *AhR-Abhängigkeit der BaP-induzierten DNA-Schädigung und der hierauf ausgeübte Effekt von Flavonoiden*

Als indirekter Parameter für die Ausbildung von BaP-induzierten DNA-Strangbrüchen wurde die Phosphorylierung der Histon H2A Isoform γ H2Ax mittels Western-Blot-Analyse und Immunfluoreszenz untersucht. Mit Hilfe des AhR-Inhibitors wurde überprüft, ob die BaP-induzierten Schäden und der Einfluss von Flavonoiden AhR-abhängig sind. Hierzu wurden Caco-2-Zellen mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μ M BaP einzeln und in Kombination mit 10 μ M Flavonoid (Quercetin) für 24 h inkubiert. Für die AhR Inhibition wurden die Caco-2-Zellen 30 min mit MNF vorinkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle (1) verwendet (siehe Abbildung 63).

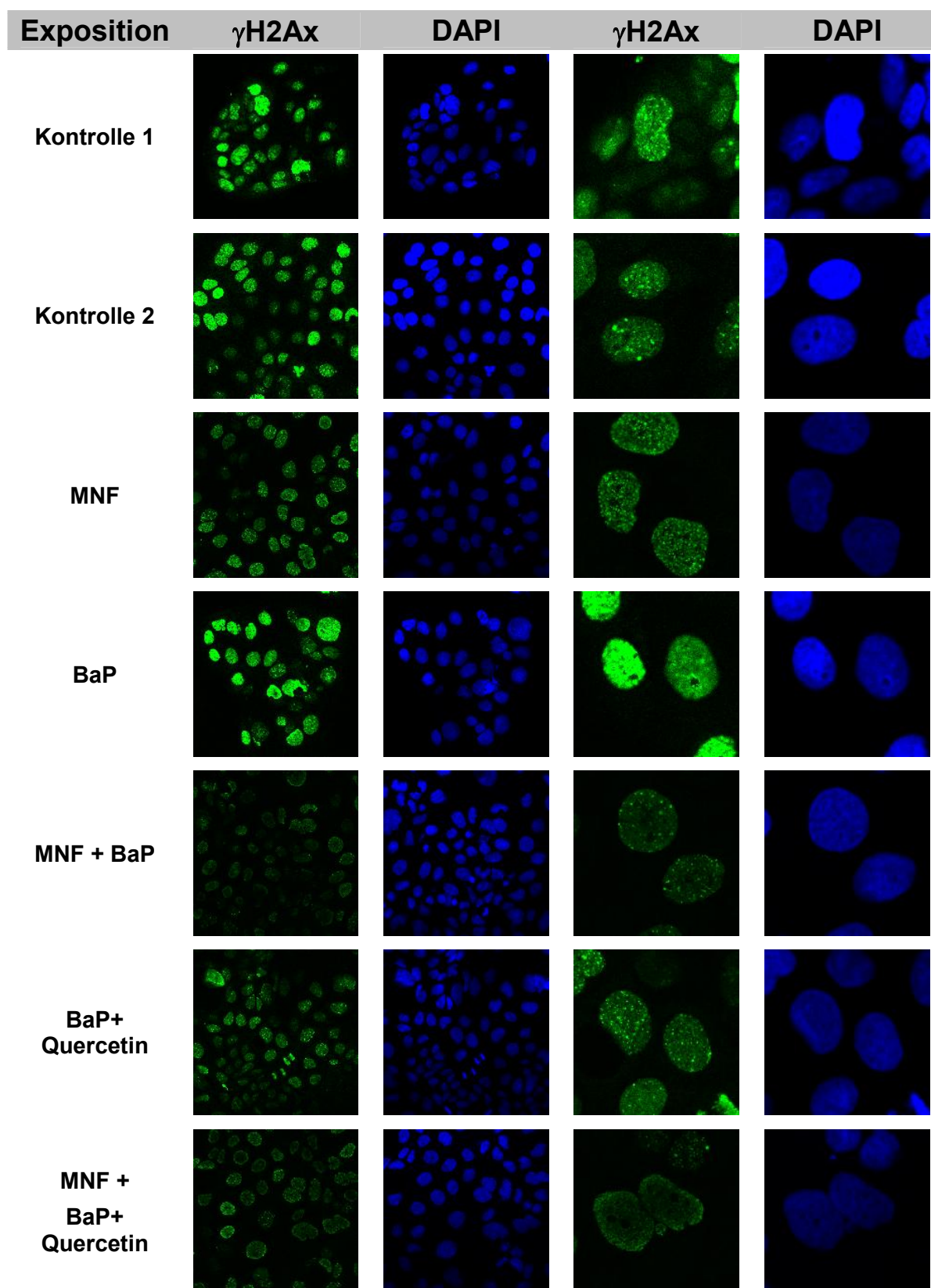


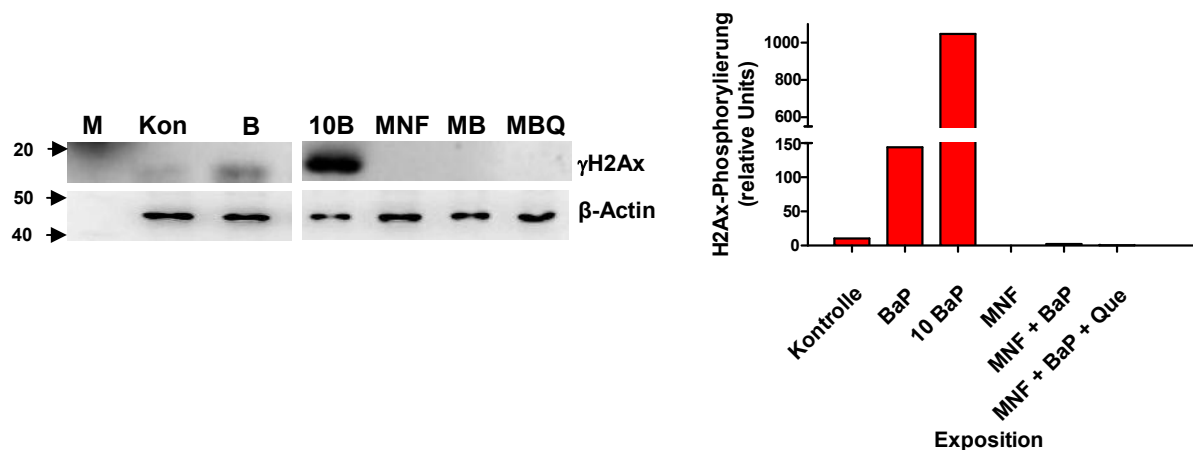
Abbildung 63: Nachweis der AhR-Abhängigkeit der BaP-induzierten DNA-Schäden über die H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen mittels Immunfluoreszenz.

γ H2Ax wurde mit einem spezifischen Erstantikörper und danach mit einem spezifischen AlexaFluor488-markierten Zweitantikörper markiert, die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP, 10 μ M Quercetin ko-inkubiert und unbehandelte Zellen (Kontrolle 1) sowie mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen (Kontrolle 2) wurden als Kontrolle verwendet. Die Caco-2-Zellen werden für die Kombinationen mit den

Einzelsubstanzen und dem Inhibitor, 30 min mit dem Inhibitor MNF vorinkubiert. Die beiden rechten Bilder sind jeweils 4-fach vergrößerte Ausschnitte aus den beiden linken Bildern.

In Abbildung 63 wird deutlich, dass der AhR-Inhibitor MNF allein keinen Effekt auf die H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen zeigt, aber ihre Induktion durch BaP unterbindet. Zusätzlich findet man in allen Proben mit MNF verstärkte Fluoreszenz in der Nähe der Kernmembran. Das Flavonoid Quercetin ist ebenfalls in der Lage die BaP-medierte Induktion der H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen zu verhindern. Die durch BaP ausgelöste H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen ist demnach vom AhR-Signalweg abhängig.

Durch vorangegangene Versuche konnte bereits ermittelt werden, dass BaP die H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen induziert und Flavonoide (Quercetin) diesem Effekt entgegen steuern (6.3.1).



a) γ H2Ax Blot

b) γ H2Ax Quantifizierung

Abbildung 64: AhR-Abhängigkeit der BaP-vermittelten H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen

a) repräsentativer Western-Blot b) Quantifizierung der Western-Blot-Banden des γ H2Ax, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, 10 μ M Quercetin und 10 μ M MNF inkubiert. Für die Kombinationen mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert.

Durch γ H2Ax-Quantifizierung über Western-Blots (Abbildung 64), wonach die BaP-medierte Induktion durch MNF komplett aufgehoben wird, wird dieses Ergebnis bestätigt. Somit wurde die AhR-Abhängigkeit der BaP-vermittelten H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen mit zwei verschiedenen Methoden bewiesen.

6.4.2 *AhR-Abhängigkeit der BaP- und Flavonoid-induzierten Apoptose in Caco-2-Zellen*

Wie bereits gezeigt besitzt BaP im Gegensatz zu den Flavonoiden einen Einfluss auf die Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen. Jedoch senken die Flavonoide den Apoptose-induzierenden Effekt von BaP. Als nächstes soll mit Hilfe des AhR-Inhibitors MNF untersucht werden, ob die beobachteten BaP- und Flavonoid-Effekte auf die Apoptose in Caco-2-Zellen AhR-abhängig sind. Folgende Parameter sollen bestimmt werden: (1) Anteil apoptotischer Zellen mit Hilfe von FACS-Analysen (Abbildung 65 & Abbildung 66), (2) Proteinexpression des Apoptosemarkers Bax mittels Western-Blot (Abbildung 67) und (3) die Caspase-3-Aktivität (Abbildung 68). Die Caco-2-Zellen wurden mit 0,1 % DMSO (Kontrolle) und 3 μ M BaP sowie 3 μ M BaP in Kombination mit jeweils 10 μ M Flavonoid für 24 h inkubiert bzw. ko-inkubiert. Für die AhR-Inhibition wurden die Caco-2-Zellen 30 min vor der eigentlichen Inkubation mit 10 μ M MNF inkubiert. Staurosporin (1 μ M) wurde als Kontrolle für die Induktion der Apoptose eingesetzt. Die Versuche wurden in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

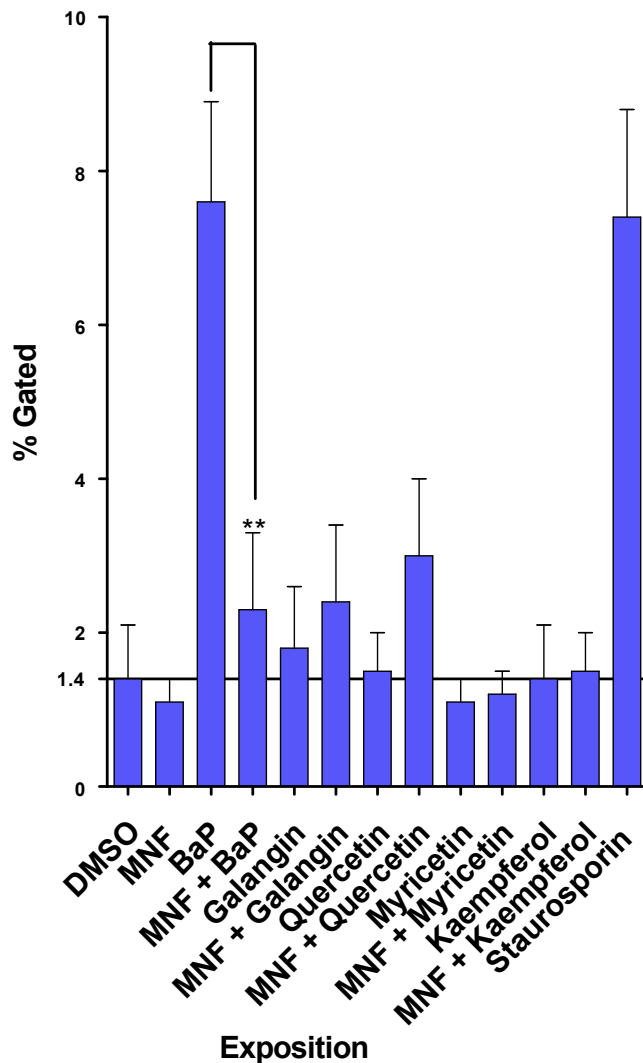


Abbildung 65: AhR-Abhängigkeit der BaP- und Flavonoideffekte auf die Apoptose in Caco-2-Zellen (FACS-Analyse).

Der AhR-Signalweg wird über den AhR-Inhibitor MNF ausgeschaltet. Die Caco-2-Zellen werden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, jeweils 10 μ M Flavonoid und dem 10 μ M des Inhibitors MNF inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurden die Anätze 30 min mit MNF vorinkubiert. (** $p < 0,01$) (n = 3)

Eine Exposition mit BaP bewirkt, wie bereits in Abbildung 16 gezeigt, zur Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen. Bei Inhibition des AhR mit MNF (Abbildung 65) und gleichzeitiger Exposition mit BaP zeigt sich, dass der Anteil apoptotischer Caco-2-Zellen signifikant ($p = 0,005$) gegenüber der BaP-induzierten Apoptose um 85 % gesenkt wird. MNF alleine hat jedoch keinen oder einen unterdrückenden Effekt auf die basale Apoptose. Die Flavonoide besitzen in Caco-2-Zellen keinen Effekt auf die Apoptose, jedoch steigert MNF in Kombination mit Galangin die Apoptose 1,7-fach und zusammen mit Quercetin ca. 2-fach gegenüber der Kontrolle.

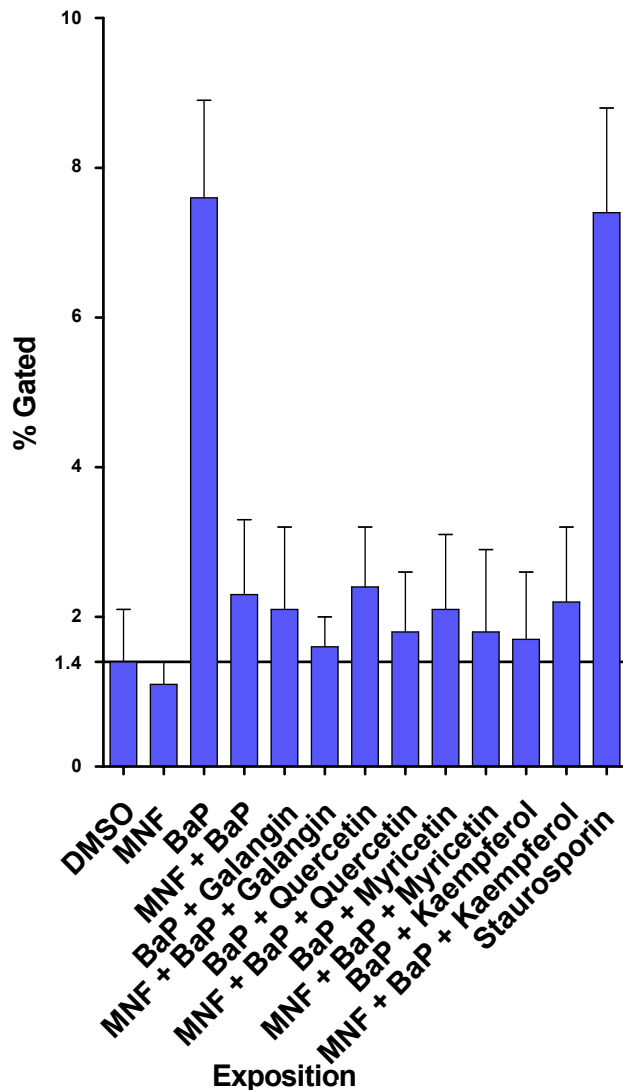


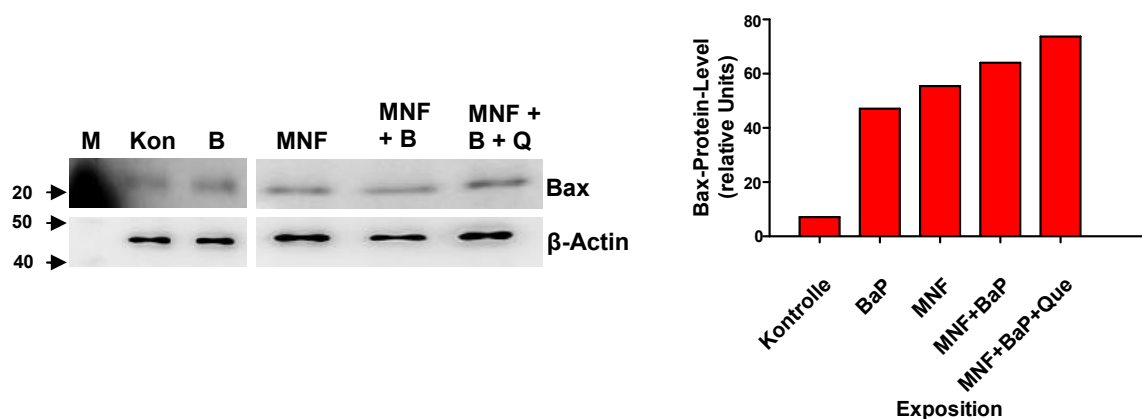
Abbildung 66: AhR-Abhängigkeit der Flavonoideffekte auf die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen (FACS-Analyse).

Der AhR-Signalweg wird über den AhR-Inhibitor MNF ausgeschaltet. Die Caco-2-Zellen werden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, jeweils 10 μ M Flavonoid ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert. (*, $p < 0,05$) (n = 3)

Generell senken alle eingesetzten Flavonoide die BaP-medierte Apoptose signifikant ab (siehe Abbildung 66 und Abbildung 41), dies kann durch die gleichzeitige Inhibierung des AhR mittels MNF gegebenenfalls noch um 9 % (MBG), 10 % (MBQ) oder 5 % (MBM) verstärkt werden. Durch diese Steigerung wird die BaP-medierte Apoptose nahezu vollständig aufgehoben (98 % MBG, 94 % MBQ und MBM). Auch für die Kombination BaP-Kaempferol mit MNF kann insgesamt ein Aufhebungseffekt von 87 % auf die BaP-induzierte Apoptose erzielt werden. Die Unterschiede zwischen den Flavonoid-behandelten Proben mit und ohne MNF sind jedoch nicht signifikant.

AhR-Abhängigkeit des Bax-Protein-Levels in Caco-2 Zellen

In Abbildung 67 wird gezeigt, dass BaP die Proteinexpression von Bax um das 5,7-fache induziert. Wenn der AhR mittels MNF ausgeschaltet wird, wird die Bax-Expression in gleichem Maße wie durch BaP induziert. Weder MNF allein noch MNF in Kombination mit Quercetin zeigen einen inhibierenden Effekt auf die BaP-vermittelte Induktion des Bax-Proteins. Demnach ist die Induktion des Bax-Proteins in Caco-2-Zellen nicht AhR-abhängig.



a) Bax Blot

b) Bax Quantifizierung

Abbildung 67: Nachweis der AhR-Abhängigkeit der BaP-mediierten Induktionen von Bax in Caco-2-Zellen.

a) repräsentative Western-Blots (n = 3) b) Quantifizierung der Bax Western-Blot-Banden, normiert auf β-Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μM BaP, 10 μM Quercetin und 10 μM MNF (AhR Inhibitor) inkubiert. Für die MNF Kombinationen wurde MNF 30 min vor-inkubiert.

AhR-Abhängigkeit der Caspase-2-Aktivität in Caco-2 Zellen

In Abbildung 68 wird deutlich, dass BaP in Caco-2-Zellen bei einer Konzentration von 3 μM eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität auf mehr als das Zweifache (218 %) erzeugt. Dieser Effekt wird durch den AhR-Inhibitor MNF komplett aufgehoben, so dass die Caspase-3-Aktivität auf Kontrollniveau bleibt. Dieser Effekt ist mit $p = 0,004$ signifikant. Ähnlich, aber nicht ganz so effizient wie MNF, wirkt auch Quercetin, das den BaP-induzierenden Effekt zumindestens größtenteils blockiert (60 %, $p = 0,007$) (siehe auch Abbildung 43). Der durch Quercetin nicht unterdrückte Anteil der Caspase-3-Aktivität wird durch zusätzliches MNF noch weiter bis auf das Kontrollniveau gesenkt ($p = 0,013$).

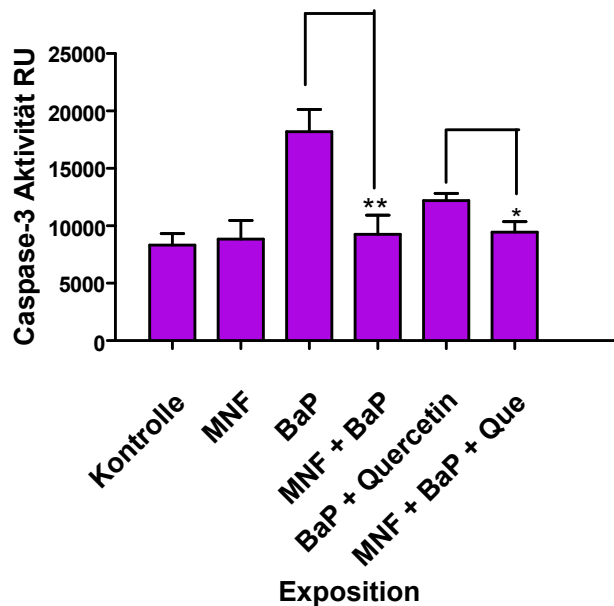


Abbildung 68: AhR-Abhängigkeit der BaP- und Flavonoid-vermittelten Effekte auf die BaP-induzierte Steigerung der Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen.

Die Caco-2-Zellen werden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, 10 μ M Quercetin und 10 μ M des Inhibitors MNF inkubiert bzw. ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert. (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

6.4.3 AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-medierten Zellzykluseffekten in Caco-2-Zellen

Mittels FACS-Analyse sollen die Zellpopulationen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus unter dem Einfluss von BaP und Flavonoiden quantifiziert werden, wobei geklärt werden soll, ob eine Abhängigkeit der Effekte von der Aktivität des AhR besteht (Abbildung 69 & Abbildung 70). Zusätzlich wurde als Parameter der Zellzykluskontrolle die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (pRb) auf AhR-Abhängigkeit in der Immunfluoreszenz (Abbildung 71) und im Western-Blot (Abbildung 72) untersucht.

Hierzu wurden Caco-2-Zellen mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und 3 μ M BaP in Kombination mit jeweils 10 μ M Flavonoid für 24 h inkubiert bzw. ko-inkubiert. Für die AhR-Inhibition wurden die Caco-2-Zellen 30 min mit MNF vorinkubiert. Nocodazol wurde bei der FACS-Analyse als Kontrolle verwendet; es arretiert die Zellen in der G2-Phase. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

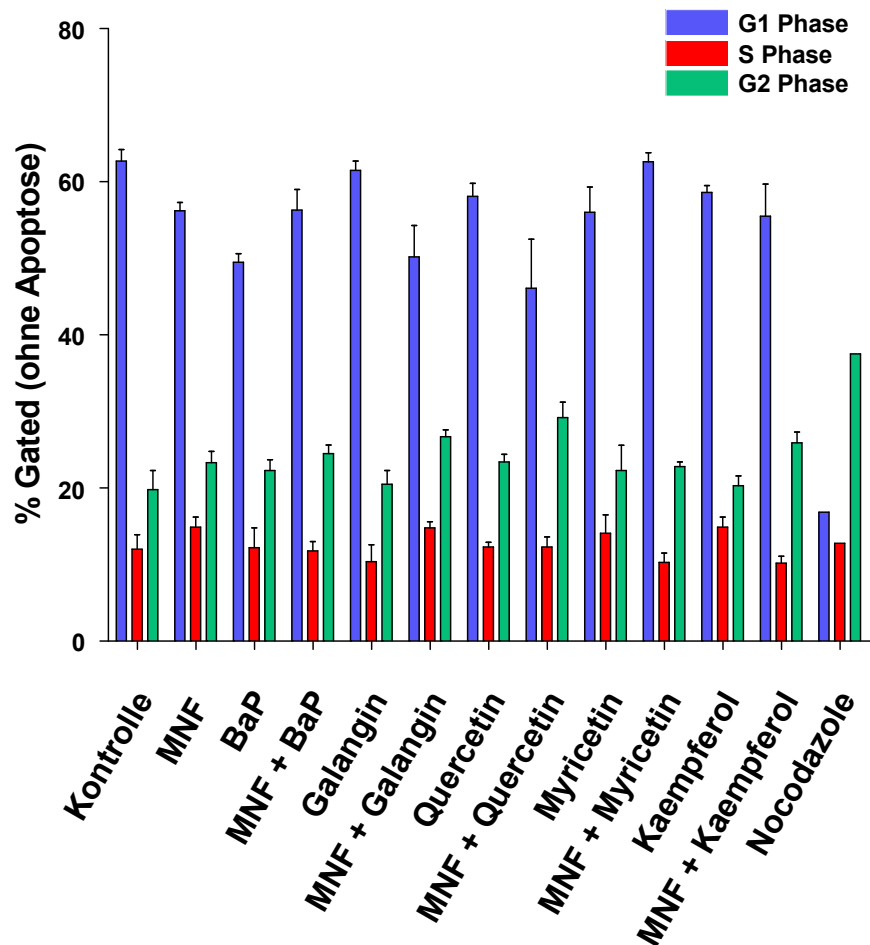


Abbildung 69: AhR-Abhängigkeit der Einzeleffekte von BaP und Flavonoiden auf den Zellzyklus in Caco-2-Zellen.

Der AhR-Signalweg wird über den AhR Inhibitor MNF ausgeschaltet. Die Caco-2-Zellen werden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, jeweils 10 μ M Flavonoid und 10 μ M MNF inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert. (n = 3)

Nach Abbildung 69 verursacht die AhR-Inhibition durch MNF bereits einen leichten S/G2-Shift um 17 % gegenüber der Kontrolle in Caco-2-Zellen. Dieser Effekt tritt ebenfalls in Kombination von MNF mit Flavonoiden, mit Ausnahme von Myricetin, auf. In Kombination mit MNF löst Galangin eine Steigerung der G2 um das 1,3-fache, Quercetin um das 1,5-fache und Kaempferol um 1,3-fache aus gegenüber der Kontrolle. Bei gleichzeitiger Inhibition des AhR und Exposition mit BaP sind keinerlei Verschiebungen in den Zellzyklusphasen zu erkennen. Das als Positivkontrolle verwendete Nocodazol führt zu einer deutlichen G2-Arretierung.

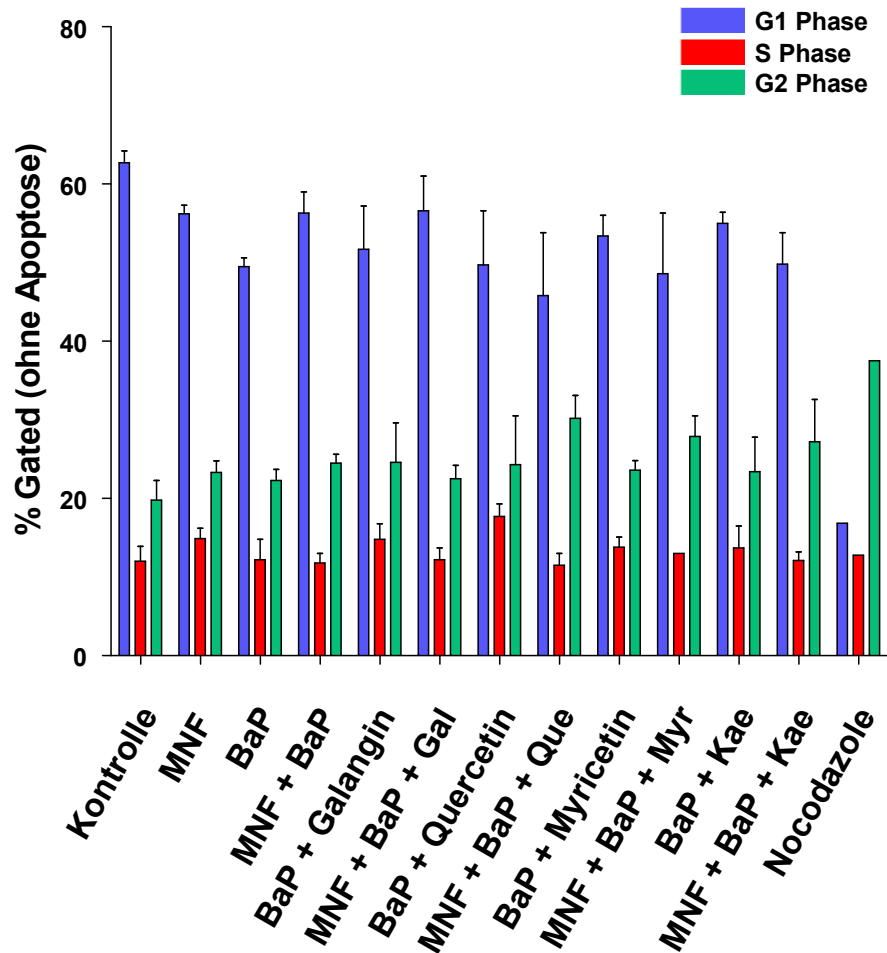


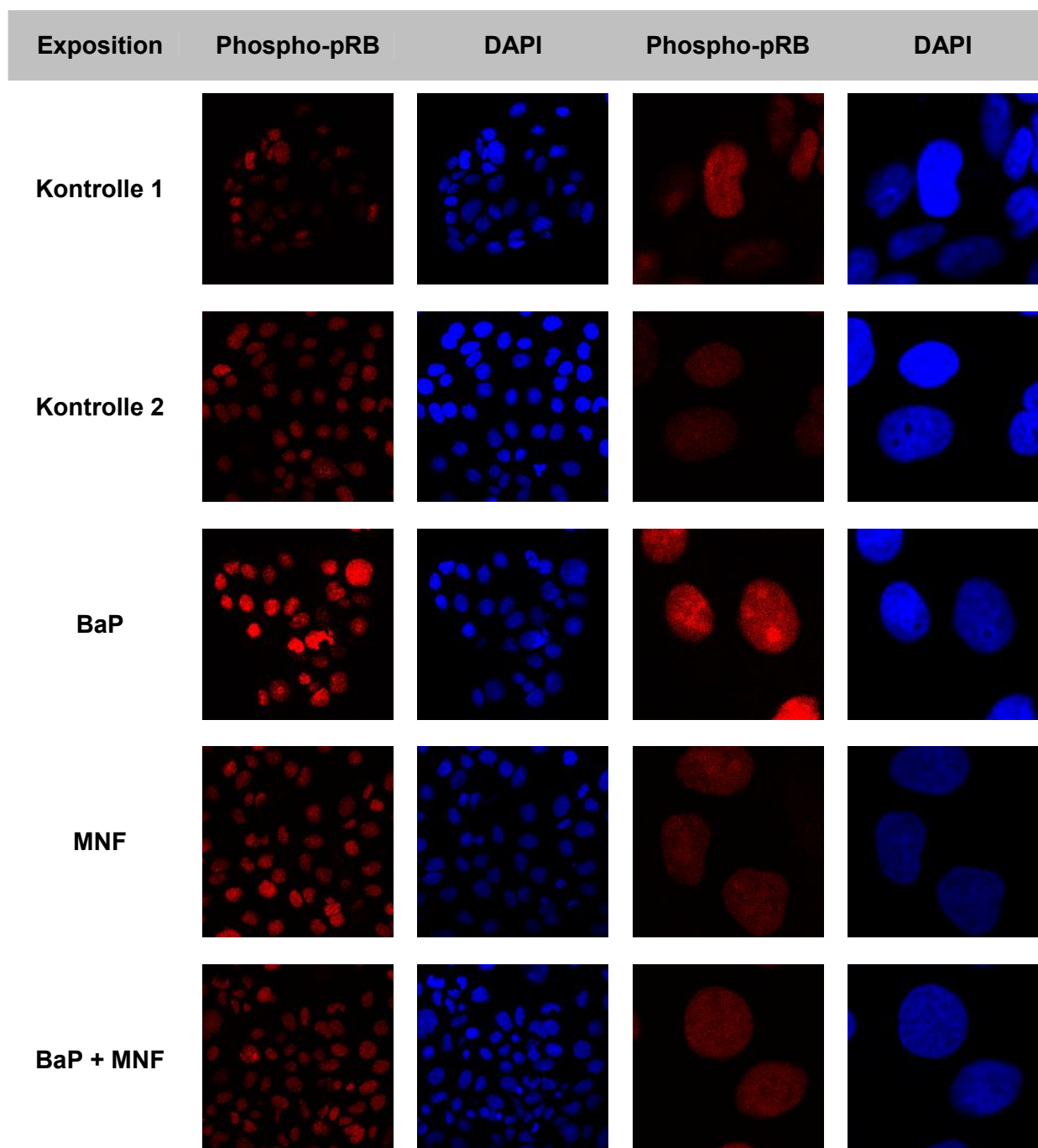
Abbildung 70: AhR-Abhängigkeit der Kombinationseffekte von BaP und Flavonoiden auf den Zellzyklus in Caco-2-Zellen.

Der AhR-Signalweg wird über den AhR-Inhibitor, MNF, ausgeschaltet. Die Caco-2-Zellen werden 24 h mit der Kontrolle (0,1 % DMSO), 3 μ M BaP und jeweils 10 μ M Flavonoid inkubiert bzw. ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert. (n = 3)

BaP in der eingesetzten Konzentration von 3 μ M besitzt keine Effekte auf den Zellzyklus in Caco-2-Zellen (Abbildung 69 & Abbildung 70). Bei gleichzeitiger Exposition von BaP und Flavonoiden ist ebenfalls kein signifikanter Effekt zu ermitteln. Bei einer Inhibition des AhR durch MNF und gleichzeitiger Exposition mit BaP und Flavonoiden (Abbildung 70) ist in den Kombinationen mit Quercetin, Myricetin und Kaempferol auch ein leichter S/G2 Phasenshift in Caco-2-Zellen zu erkennen und zwar um das 1,5-fache (MBQ), 1,4-fache (MBM und auch 1,4-fache (MBK) gegenüber der Kontrolle.

AhR-Abhängigkeit der Rb-Protein-Phosphorylierung in Caco-2 Zellen

Die relativen Spiegel des phosphorylierten-Rb-Proteins wurden sowohl mittels Immunfluoreszenz (Abbildung 71) als auch mittels Western-Blot (Abbildung 72) untersucht. Behandlung der Zellen siehe oben.



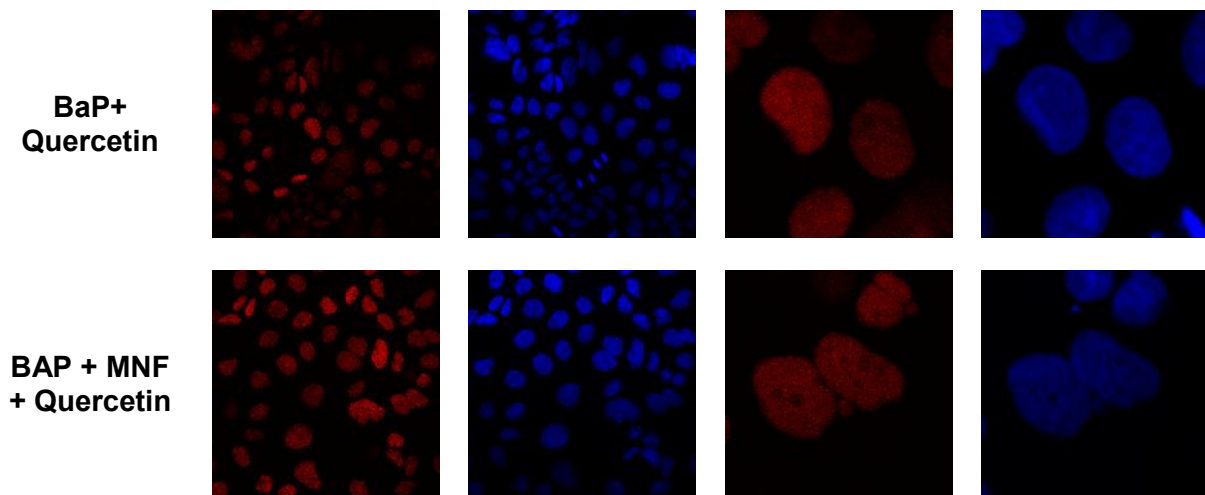
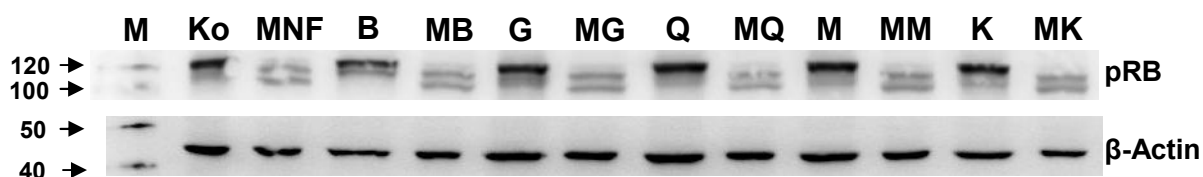
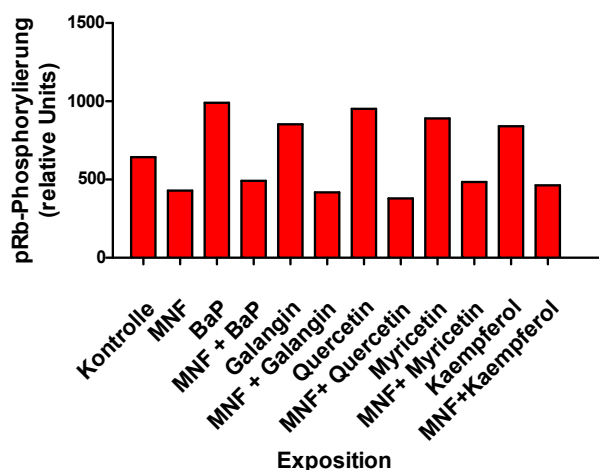


Abbildung 71: Nachweis der AhR-Abhängigkeit der BaP-induzierten Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins in Caco-2-Zellen über Immunfluoreszenz. Das Phospho-pRb wurde mit einem spezifischen C³-markierten Zweitantikörper markiert, die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Caco-2-Zellen werden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 µM BaP, 10 µM Quercetin und 10 µM des Inhibitors MNF inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert. Als weitere Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet (1). Die rechten beiden Bilder sind jeweils 4-fach vergrößerte Ausschnitte aus den beiden linken Bildern.

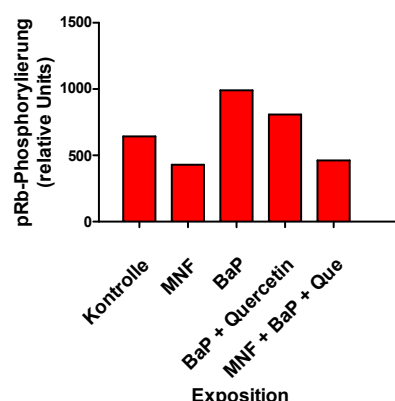
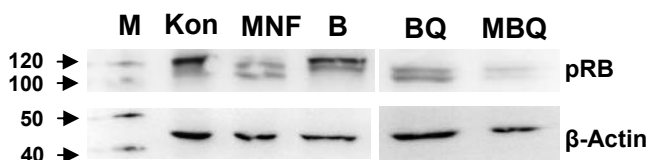
Wie in Abbildung 71 gezeigt, bewirkt die Exposition mit BaP eine deutliche Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen (siehe auch Abbildung 22). MNF allein zeigt keine Auswirkung auf die pRb-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen, es unterdrückt aber ebenso wie Quercetin die BaP-vermittelte pRb-Phosphorylierung. Zusätzliches MNF führt hier zu keiner oder einer nur marginalen weiteren Absenkung des Phospho-pRb-Spiegels.



a) Phospho-Rb-Protein Blot



b) Phospho-Rb-Protein Quantifizierung



c) Phospho-Rb-Protein Blot

d) Phospho-Rb-Protein Quantifizierung

Abbildung 72: AhR Abhängigkeit der BaP- und Flavonoideffekte auf die Rb-Protein-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen

(M = Proteingrößenmarker) a) repräsentative Western-Blots. b+d) Quantifizierung Western-Blot-Banden der Rb-Protein-Phosphorylierung, normiert auf β-Actin. Die Caco-2-Zellen werden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μM BaP, 10 μM Quercetin und 10 μM des Inhibitors MNF inkubiert bzw. ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert.

BaP und Flavonoide induzieren die Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen um 54 % (BaP) und ca. 30 % (Flavonoide) (Abbildung 23). Die AhR-Inhibition durch MNF führt jeweils zu einer nahezu kompletten Unterbindung der durch BaP und Flavonoide induzierten pRb-Phosphorylierung (Abbildung 72 a +b). Die BaP-

und Flavonoid- vermittelte Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins in Caco-2-Zellen ist somit AhR-abhängig. Quercetin wirkt der BaP-medierte Rb-Protein-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen entgegen und senkt diese um ca. 53 %. Dieser Effekt wird durch die Inhibition des AhR noch verstärkt und führt darüber hinaus zu einer Unterdrückung des Basal-Spiegels (Abbildung 72 c + d).

6.4.4 AhR-Abhängigkeit der BaP- und Flavonoid-Effekte auf die Expression von Komponenten des AhR-Signalweges in Caco-2-Zellen

Zur Überprüfung, ob die bereits ermittelten BaP- und Flavonoideffekte auf Komponenten des AhR-Signalweges auf mRNA- oder Protein-Ebene vom AhR selbst abhängig sind, wurden Caco-2-Zellen mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, je 10 μ M Flavonoid und in Kombination für 24 h inkubiert bzw. ko-inkubiert. Für die AhR-Inhibition wurden die Caco-2-Zellen 30 min mit 10 μ M MNF vor-inkubiert. Zur Ermittlung des mRNA-Levels wurde eine Real-Time-PCR und der Protein-Ebene Western-Blot-Analysen durchgeführt. Alle Versuche wurden in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

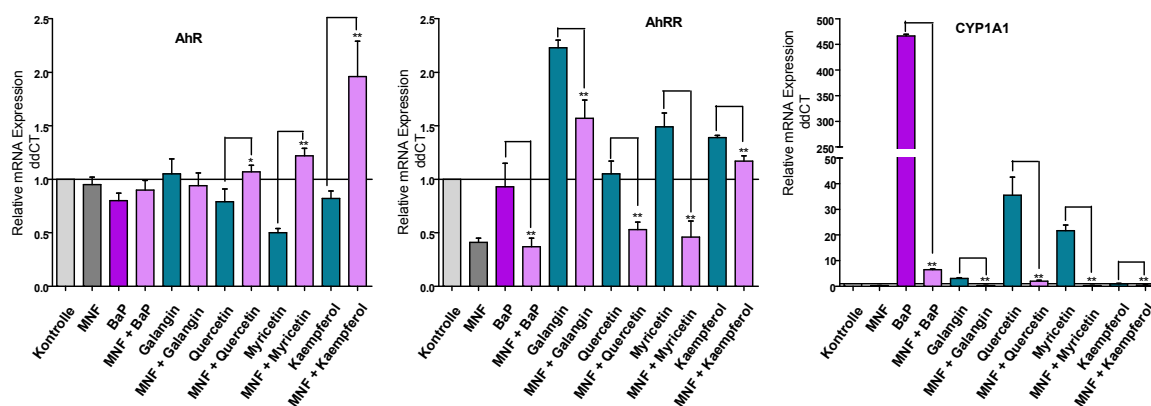


Abbildung 73: AhR-Abhängigkeit der Veränderungen des mRNA-Spiegels von AhR Komponenten (AhR, AhRR) und des AhR-Zielgens (CYP1A1) durch BaP und Flavonoide in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).

Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1% DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, 10 μ M je Flavonoid und 10 μ M MNF inkubiert bzw. ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert. (*, $p < 0,05$ // **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

In Abbildung 73 wird gezeigt, dass weder BaP noch der AhR-Inhibitor MNF einen Effekt auf den AhR-Transkript-Spiegel haben, während Myricetin ihn auf ca. die Hälfte erniedrigt. Der AhR-Inhibitor MNF bewirkt in Gegenwart der Flavonoide Quercetin ($p = 0,022$), Myricetin ($p < 0,001$) und Kaempferol ($p = 0,004$) eine signifikante Steigerung des AhR-mRNA-Levels in Caco-2-Zellen um 44 % (Q), 144 % (M) und 139 % (K). Der Transkript-Spiegel des AhR-Repressors (AhRR) wird durch BaP nicht verändert, aber durch einige Flavonoide gesteigert, zweifach durch Galangin, 1,5-fach durch Myricetin und 1,4-fach durch Kaempferol. Die Inhibition des AhR unterdrückt in Kombination mit BaP den basalen AhRR-mRNA-Spiegel um 60 % ($p = 0,014$) in Kombination mit den Flavonoiden wird die Steigerung des AhRR-

mRNA-Spiegel durch die Flavonoide Galangin, Myricetin und Kaempferol signifikant verhindert. Bei Quercetin ist kein Effekt auf den AhR-mRNA-Spiegel nachweisbar, die starke Unterdrückung bis unter den Basal-Spiegel in Kombination mit MNF wird nur durch MNF hervorgerufen (Q: $p = 0,003$). Auch bei Myricetin ist dieser Effekt des MNF sichtbar (M: $p < 0,001$). Die Kaempferol-basierte Steigerung des AhR-mRNA-Spiegels wird durch MNF nahezu auf Kontrollniveau abgesenkt (K: $p = 0,002$) und die Galangin-vermittelte Steigerung wird um 50 % verhindert (G: $p = 0,003$). Das Zielgen des AhR und das wichtigste Enzym im BaP Metabolismus, das CYP1A1, werden auf mRNA-Ebene signifikant durch BaP 470-fach gegenüber der Kontrolle induziert ($p < 0,001$). Auch die Flavonoide (G, Q und M) bewirken eine signifikante CYP1A1-Induktion bis zu 35-fach gegenüber der Kontrolle (Q). Durch MNF können sowohl die BaP- als auch Flavonoid-medierte Steigerungen des CYP1A1-mRNA-Level signifikant (BaP: $p < 0,001$) (G: $p < 0,001$ // Q: $p = 0,001$ // M: $p < 0,001$ // K: $p = 0,013$) aufgehoben werden, bei BaP um 98 % und bei den Flavonoiden ebenfalls um bis zu 98 % bei Myricetin und 95 % bei Quercetin.

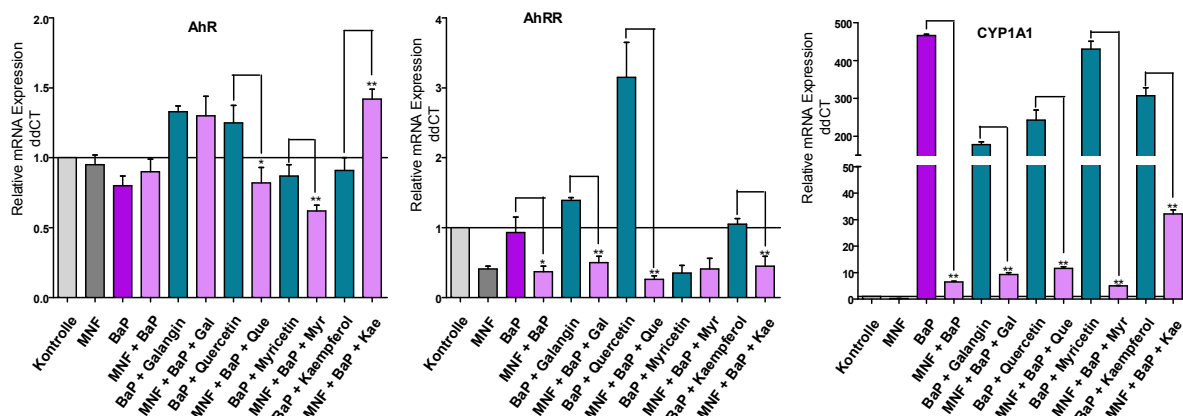


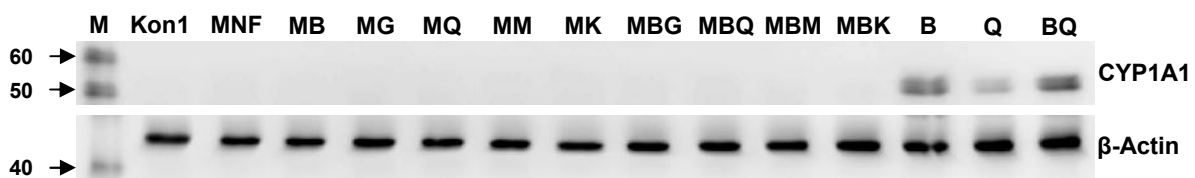
Abbildung 74: AhR-Abhängigkeit von Flavonoideffekten auf BaP-medierte Veränderungen des mRNA-Spiegels von AhR-Komponenten (AhR, AhRR und CYP1A1) in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).

Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, 10 μ M je Flavonoid inkubiert, bzw. ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert. (*, $p < 0,05$ // **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

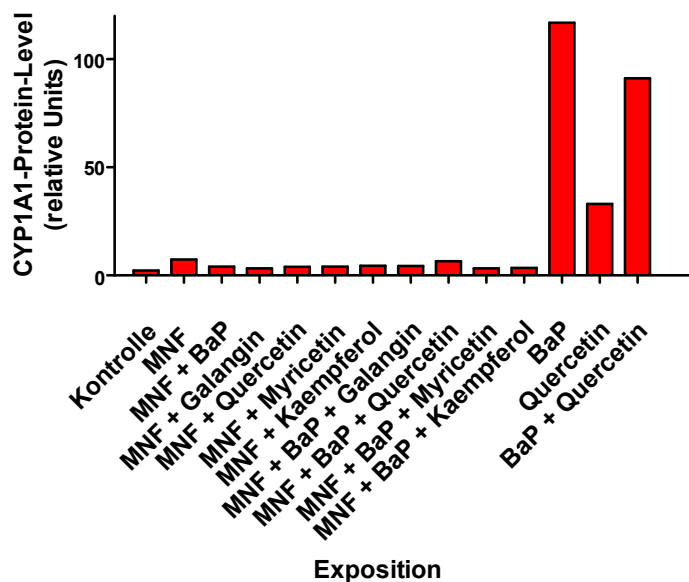
Wie in Abbildung 74 gezeigt, wird der AhR-mRNA-Level in Caco-2-Zellen durch die Kombinationen BaP und Galangin um 33 % angehoben und durch MNF wird keine Änderung hervorgerufen. Durch die AhR-Inhibition werden die BaP-Quercetin- und BaP-Myricetin-vermittelte AhR-mRNA-Induktionen signifikant unter das Basal-Level abgesenkt (MBQ: $p = 0,011$ // MBM: $p = 0,008$). Die Kombination BaP und Kaempferol zeigt per se keinen Effekt auf den mRNA-Level des AhR in Caco-2-

Zellen, jedoch steigert die Inhibition des AhR bei gleichzeitiger Exposition mit BaP und Kaempferol signifikant ($p = 0,001$) den mRNA-Level des AhR um 56 %. BaP zeigt keinen Effekt auf den AhR-mRNA-Level in Caco-2-Zellen, jedoch wird dieser durch die AhR-Inhibition bei gleichzeitiger BaP-Exposition signifikant ($p = 0,014$) um 60 % abgesenkt. Der Effekt der Flavonoid-BaP-Kombinationen kann durch die AhR-Inhibition in Caco-2-Zellen auch komplett aufgehoben werden, mit Ausnahme der BaP-Myricetin-Kombination (BG: $p < 0,001$ // BQ: $p < 0,001$ // BK: $p = 0,003$).

Die BaP- und Flavonoid-vermittelte Erhöhung der CYP1A1-mRNA ist AhR-abhängig. Der hemmende Effekt der Flavonoide auf die BaP vermittelte Induktion der CYP1A1-mRNA wird durch den AhR-Inhibitor MNF noch signifikant verstärkt (MBG: $p < 0,001$ // MBQ: $p < 0,001$ // MBM: $p < 0,001$ // MBK: $p < 0,001$). Es kann eine Reduktion des CYP1A1-mRNA-Level um bis zu 98 % (MBM) erreicht werden.



a) CYP1A1 Blot



b) CYP1A1 Quantifizierung

Abbildung 75: Nachweis der AhR-Abhängigkeit von BaP, Flavonoiden und Flavonoid-effekten, der CYP1A1 Proteininduktion in Caco-2-Zellen (M = Proteingrößenmarker) a) repräsentativer Blot b) Quantifizierung der CYP1A1 Western-Blot-Banden, normiert auf β -Actin. Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, 10 μ M je Flavonoid inkubiert, bzw. ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert.

Wie bereits in Abbildung 27 gezeigt wurde, bewirkt BaP in Caco-2-Zellen eine drastische Induktion von CYP1A1 um ca. 4000 % gegenüber der Kontrolle. Quercetin allein induziert CYP1A1 ebenfalls um 1300 % und ist aber gleichfalls in der Lage, die BaP-mediierte CYP1A1-Induktion abzuschwächen (Abbildung 75). Alle durch BaP oder Flavonoide ausgelösten Induktionseffekte werden durch die Inhibition des AhR in Caco-2-Zellen nahezu vollständig aufgehoben um bis zu 96 % für BaP und 88 % für Quercetin. Die Induktion des CYP1A1-Proteins in Caco-2-Zellen ist sowohl bei BaP als auch bei Flavonoiden AhR-abhängig (Abbildung 75).

6.4.5 AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekten auf die CYP1A1-

Aktivität in Caco-2-Zellen

Der Einfluss von BaP und Flavonoiden auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen konnte bereits gezeigt werden (Abbildung 28) sowie auch der reduzierende Effekt mancher Flavonoide (Quercetin, Galangin) auf die BaP-mediierte Aktivitätssteigerung von CYP1A1 in Caco-2-Zellen (Abbildung 51). Da der AhR-Inhibitor MNF eine Induktion sowohl von CYP1A1-mRNA als auch CYP1A1-Protein durch BaP unterdrückt, sollte dies auch für die entsprechende Enzymaktivität zutreffen und soll im Folgenden überprüft werden (Abbildung 76).

Hierfür wurde die CYP1A1-abhängige Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität (EROD) in Caco-2-Zellen bestimmt. Für alle Versuche wurden die Caco-2-Zellen über 24 h mit 3 μ M BaP, 10 μ M Quercetin, 10 μ M Galangin und 10 μ M MNF inkubiert. Als Kontrolle dienten mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen. Die Versuche wurden in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

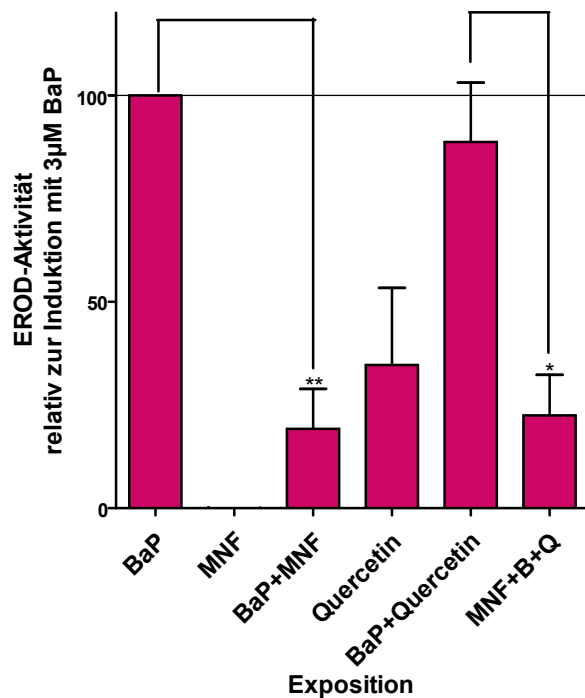


Abbildung 76: AhR-Abhängigkeit der Effekte von BaP und Flavonoiden (Quercetin) auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen.

Die EROD-Aktivität wurde nach einer 24 h Inkubation der Zellen mit 3 µM BaP, 10 µM Quercetin und 10 µM MNF in den angegebenen Kombination bestimmt. Die durch BaP induzierte CYP1A1-Aktivität wurde auf 100 % festgesetzt. (*, $p < 0,05$ // **, $p < 0,001$) ($n = 3$)

Die BaP-medierte CYP1A1-Aktivitätssteigerung in Caco-2-Zellen kann durch die AhR-Inhibierung signifikant um 80 % herunter gesetzt werden ($p < 0,001$). Quercetin reduziert die BaP-medierte CYP1A1-Aktivitätssteigerung in Caco-2-Zellen um 65 %. Zusätzliches MNF hemmt die BaP-abhängige Induktion weiter bis auf das Niveau der BaP+MNF-Probe (MBQ: $p = 0,003$), mit anderen Worten, Quercetin bewirkt keine Inhibierung über den Effekt von MNF hinaus (Abbildung 76).

6.4.6 AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekte auf relevante

Signalwege

In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl Einzeleffekte der Flavonoide und BaP, als auch Kombinationseffekte auf die Expression der Komponenten anderer Signalwege wie MAPK (JNK, p38, ERK), AKT (AKT, PTEN, PI3K) und Nrf2 (Nrf2, keap1) in Caco-2-Zellen existieren (siehe 6.2.6 & 6.3.6). Es soll nun überprüft werden, ob die ermittelten Effekte AhR-abhängig sind. Hierfür wird, wie bereits beschrieben, der AhR-Inhibitor MNF eingesetzt. Die Effekte sollen auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR und bei den MAPK mittels Western-Blot zusätzlich auf Protein-Ebene auch hinsichtlich der Proteinphosphorylierung ermittelt werden.

Die Caco-2-Zellen wurden mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, jeweils 10 μ M Flavonoid und 3 μ M BaP in Kombination mit jeweils 10 μ M Flavonoid für 24 h inkubiert, bzw. ko-inkubiert.

AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekten auf **MAPK**-Signalwege in Caco-2 Zellen

In Abbildung 77 wird deutlich, dass der mRNA-Spiegel der JNK in Caco-2-Zellen durch BaP und Quercetin um 48 % bzw. 20 % gegenüber der Kontrolle unterdrückt wird. Durch die Inhibition des AhR kann der BaP- und Quercetin-medierte Effekt signifikant (B: $p < 0,001$ // Q: $p = 0,036$) aufgehoben werden.

Die MAPK p38 wird weder durch BaP noch durch Flavonoide signifikant in Caco-2-Zellen beeinflusst. Auch in Kombination mit dem AhR-Inhibitor MNF werden keine Effekte auf p38 sichtbar.

Der mRNA-Spiegel der dritten untersuchten MAPK, ERK, wird in Caco-2 durch BaP um 35 % sowie durch die Flavonoide Galangin und Quercetin signifikant um 13 % bzw. 32 % gegenüber der Kontrolle abgesenkt. Dieser Effekt kann durch Inhibition des AhR mit MNF aufgehoben werden ($p = 0,014$). Bei einer Exposition mit Galangin und gleichzeitiger Inhibition des AhR wird der basale mRNA-Level von ERK in Caco-2-Zellen signifikant um 30 % unterdrückt ($p = 0,015$).

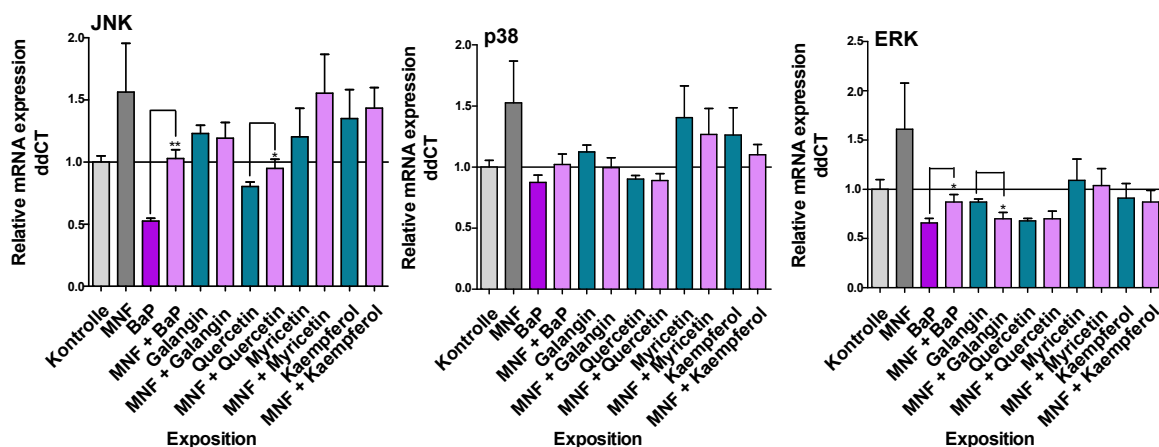


Abbildung 77: Nachweis der AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekten auf den mRNA-Spiegel der MAP-Kinasen JNK, p38 und ERK in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.

Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

Aus Abbildung 77 geht wie schon vorher gezeigt hervor, dass durch die Inhibition des AhR die inhibierenden BaP-Effekte auf den mRNA-Spiegel der JNK in Caco-2-Zellen signifikant aufgehoben werden (MB: $p < 0,001$). Des Weiteren zeigt die Abbildung 77, dass die Flavonoide (mit Ausnahme von Galangin) nur einen marginalen bzw. keinen Effekt auf die BaP-medierte Hemmung des JNK-mRNA-Level haben. Durch den AhR-Inhibitor MNF werden diese jedoch nicht nur auf Kontrollniveau angehoben sondern darüber hinaus gegenüber der Kontrolle gesteigert um 50 % Galangin, 30 % Quercetin, 25 % Myricetin und 15 % Kaempferol. MNF allein steigert bereits den JNK-mRNA-Spiegel um 50 % gegenüber der Kontrolle. Die Anhebung durch MNF ist gegenüber der Kombination BaP und Flavonoid signifikant (MBG: $p = 0,020$ // MBQ: $p < 0,001$ // MBM: $p = 0,011$ // MBK: $p = 0,001$). Die BaP- und Flavonoid-medierte Erniedrigung der JNK-mRNA in Caco-2-Zellen ist AhR-abhängig.

BaP zeigt einen nur leicht hemmenden Effekt auf den mRNA-Level der p38 MAPK in Caco-2-Zellen. Durch die AhR-Hemmung wird dieser aufgehoben. Die Flavonoide, bis auf Galangin, sind nicht in der Lage den leichten BaP-Effekt zu beeinflussen. Die AhR-Inhibierung führt jedoch dazu, dass die BaP-medierte Hemmung auch in Kombination mit Flavonoiden aufgehoben wird. Eine signifikante Änderung durch die AhR-Inhibition tritt jedoch nur bei Quercetin und Kaempferol auf, wodurch der p38-mRNA-Spiegel auf Kontrollniveau angehoben wird (Kaempferol) oder sogar über das Kontrollniveau um 20 % gesteigert wird (Quercetin). Dieser Anstieg ist signifikant gegenüber den BaP-Flavonoid-Kombinationen (BQ: $p = 0,008$ // BK: $p = 0,023$).

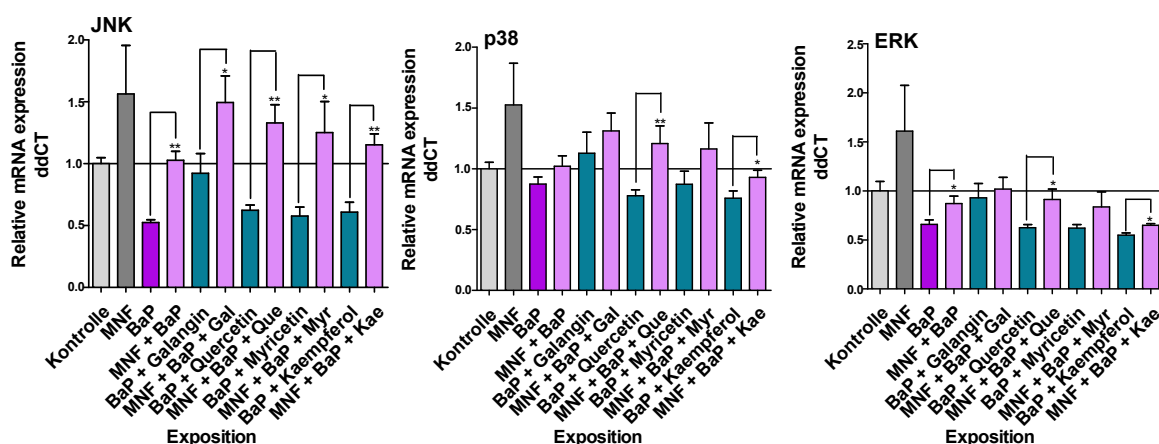
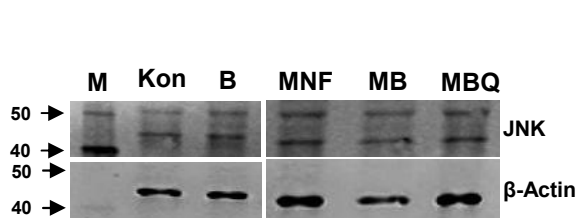


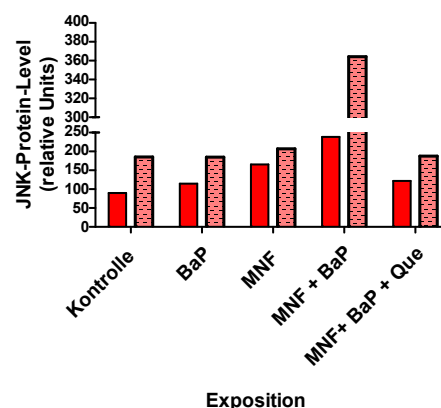
Abbildung 78: Nachweis von Flavonoideffekten auf BaP-induzierte Veränderungen des mRNA-Spiegels der MAPK (JNK, p38 und ERK) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR. Die Zellen wurden 24 h mit der Kontrolle (0,1 % DMSO), 3 μ M BaP, je 10 μ M Flavonoid inkubiert, bzw. ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

Wie auch bei den anderen beiden MAPK besitzt BaP einen inhibierenden Effekt auf den mRNA-Spiegel der MAPK ERK in Caco-2-Zellen. Durch die AhR-Inhibition wird auch hier der entsprechende BaP-Effekt signifikant aufgehoben (MB: $p = 0,014$). Die Flavonoide, bis auf Galangin, können dem BaP-medierten Effekt auf den ERK mRNA-Spiegel in Caco-2-Zellen nicht entgegenwirken. Bei gleichzeitiger Inhibition des AhR durch MNF wird der ERK mRNA-Spiegel in Caco-2-Zellen durch fast alle BaP-Flavonoid-Kombinationen nicht erniedrigt. Eine Ausnahme bildet hier die BaP/Kaempferol-Kombination. MNF wirkt der ERK-mRNA-Suppression durch die BaP-Flavonoid-Kombinationen deutlich entgegen, wobei die Unterschiede für die Kombinationen mit Quercetin und Kaempferol wieder signifikant sind (MBQ: $p = 0,012$ // MBK: $p = 0,003$). Bei der Kombination BaP-Quercetin kann MNF den ERK-mRNA-Spiegel wieder auf Kontrollniveau anheben (10 % Suppression gegenüber der Kontrolle). Trotz AhR-Inhibition liegt bei der BaP-Kaempferol Kombination immer noch eine Suppression des ERK-mRNA-Levels um 35 % gegenüber der Kontrolle vor. Ohne MNF jedoch um 45 % gegenüber der Kontrolle.

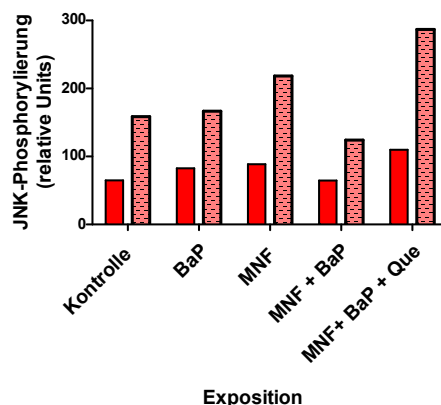
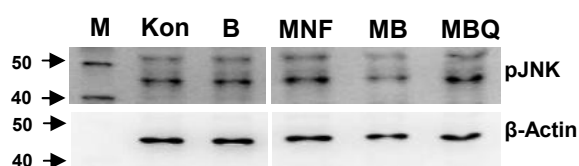
Generell lässt sich sagen, dass BaP die mRNA-Spiegel der untersuchten MAP-Kinasen senkt, die Flavonoide mit Ausnahme von Galangin nicht in der Lage sind, diesem Effekt entgegenzuwirken und alle in diesem Zusammenhang untersuchten Effekte AhR-abhängig sind (Abbildung 78).



a) JNK Blot



b) JNK Quantifizierung

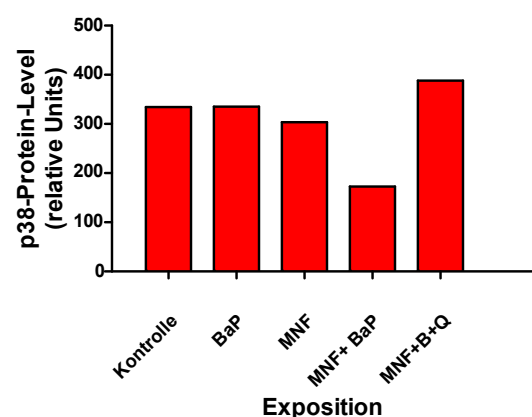
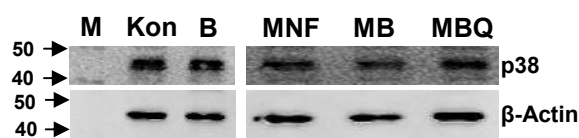


c) pJNK Blot

d) pJNK Quantifizierung

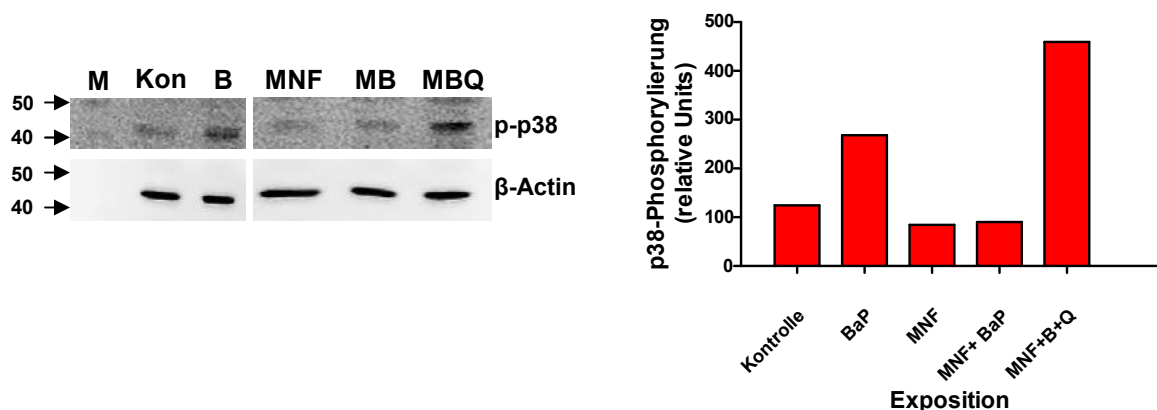
Abbildung 79: AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-medierten Effekten auf die JNK und deren Phosphorylierung in Caco-2-Zellen (M = Proteingrößenmarker). a,c) repräsentative Western-Blots (n = 3). b,d) Quantifizierung der JNK und pJNK Western-Blot-Banden, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und 10 μ M Quercetin ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert. rote Balken: obere Blot-Bande; strukturierte Balken: untere Blot-Bande.

Auf der Proteinebene kann die inhibierende Wirkung von BaP auf die JNK in Caco-2-Zellen (Abbildung 77 & Abbildung 78) nicht bestätigt werden (Abbildung 79). Die Blockierung des AhR mit MNF steigert in Gegenwart von BaP allerdings die JNK-Induktion in Caco-2-Zellen. BaP ist nicht in der Lage die Phosphorylierung der JNK zu induzieren, während eine zusätzliche AhR-Inhibition den basalen Phospho-JNK-Spiegel marginal senkt (Abbildung 79).



a) p38 Blot

b) p38 Quantifizierung



c) p-p38 Blot

d) p-p38 Quantifizierung

Abbildung 80: AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-medierten Effekten auf die MAPK p38 und dessen Phosphorylierung in Caco-2-Zellen (M = Proteingrößenmarker). a,c) repräsentative Western-Blots. b,d) Quantifizierung der p36 und p-p38 Western-Blot-Banden, normiert auf β-Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μM BaP und 10 μM Quercetin ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert

Wie Abbildung 80 verdeutlicht, werden die Transkript-Spiegel der MAPK p38 durch BaP in Caco-2-Zellen nicht beeinflusst, jedoch durch die Inhibition des AhR bei gleichzeitiger BaP-Exposition um 48 % supprimiert. Die Aktivierung von p38 durch Phosphorylierung wird durch BaP in Caco-2-Zellen um 116 % gegenüber der Kontrolle induziert. Dieser Effekt wird durch Hemmung des AhR mit MNF aufgehoben. Bei Exposition von Caco-2-Zellen mit BaP und dem Flavonoid Quercetin und gleichzeitiger Hemmung des AhR ist eine starke Induktion der p38-Phosphorylierung um 270 % gegenüber der Kontrolle sichtbar (Abbildung 80).

AhR-Abhängigkeit der Induktion der **AKT**-Signalwegs-Komponenten in Caco-2 Zellen

Weder BaP noch die Flavonoide zeigen generell einen Einfluss auf den AKT-mRNA-Spiegel in Caco-2-Zellen (Abbildung 81). Durch den AhR-Inhibitor MNF wird der basale AKT-mRNA-Spiegel jedoch gegenüber der Kontrolle signifikant um 56 % induziert ($p = 0,022$). Bei gleichzeitiger Hemmung des AhR und Exposition mit BaP ist keine Änderung der mRNA-Induktion von AKT in Caco-2-Zellen zu erkennen. Im Gegensatz zu BaP, führt die AhR-Inhibition in Kombination mit Flavonoiden zu einer marginalen Hemmung des AKT-mRNA-Spiegels um 8 % Galangin, 11 % Quercetin, 26 % Myricetin und 16 % Kaempferol. Lediglich bei Galangin und Quercetin ist diese Unterdrückung der AKT-mRNA signifikant (MG: $p = 0,033$ // MQ: $p = 0,032$).

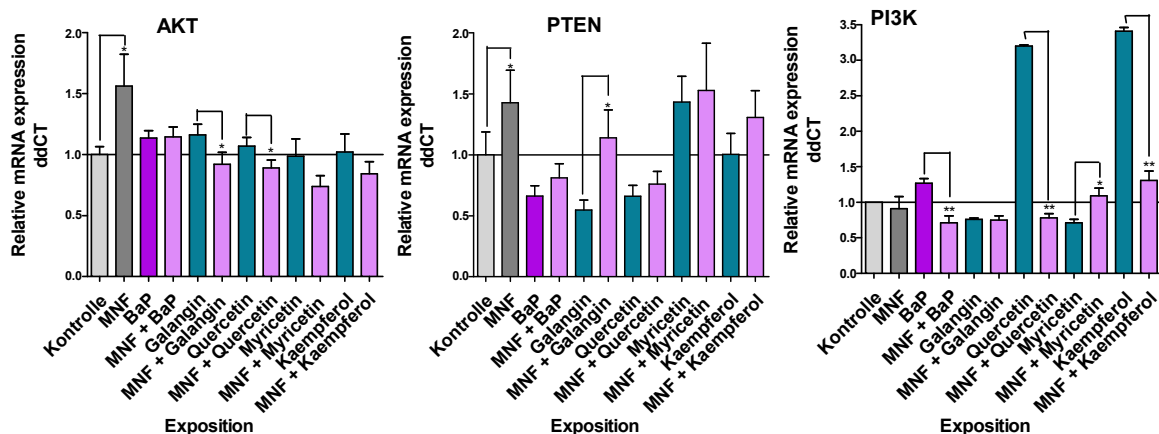


Abbildung 81: AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekten auf den mRNA-Spiegel der AKT-Signalwegkomponenten (AKT, PTEN und PI3K) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.

Die Zellen wurden 24 h mit der 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

Der basale PTEN-mRNA-Spiegel wird ebenfalls durch die AhR-Inhibition in Caco-2-Zellen induziert (Abbildung 81). BaP selbst besitzt einen leicht supprimierenden Effekt (34 %) auf den PTEN-mRNA-Spiegel in Caco-2-Zellen aber es konnte keine Veränderung bei gleichzeitiger AhR-Hemmung erzielt werden. Für die Flavonoide zeigt sich bei gleichzeitiger Hemmung des AhR eine Steigerung der mRNA-Induktion in Caco-2-Zellen. Eine gleichzeitige AhR-Inhibition führt zu einer kompletten Aufhebung des unterdrückenden Galangin-Effekts und darüber hinaus eine

Anhebung des PTEN-mRNA-Spiegels um 14 % über Kontrollniveau. Dieser Anstieg ist gegenüber Galangin alleine signifikant (MG: $p = 0,014$).

Der mRNA-Spiegel der PI3K kann durch BaP in Caco-2-Zellen um 27 % gegenüber der Kontrolle induziert werden. Dieser Effekt wird durch Hemmung des AhR mit MNF signifikant aufgehoben ($p = 0,001$). Die Flavonoide, Quercetin und Kaempferol, steigern signifikant die Induktion des mRNA-Levels der PI3K in Caco-2-Zellen um 220 % und 240 %, während eine AhR-Inhibition diesen Effekt auf Kontrollniveau absenkt (MQ: $p < 0,001$ // MK: $p < 0,001$). Myricetin hingegen inhibiert die Induktion des PI3K-mRNA-Spiegels um 30 %, bei AhR Hemmung wird aber auch dieser Effekt signifikant aufgehoben ($p = 0,006$).

Ob AhR-Abhängigkeiten bei der Wirkung von BaP und Flavonoiden auf den AKT-Signalweg bestehen wird in Abbildung 82 gezeigt.

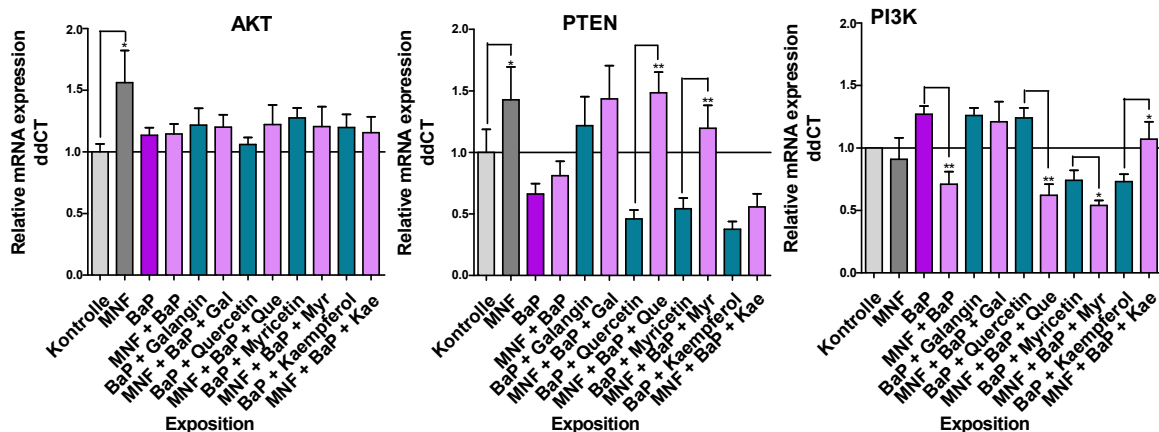


Abbildung 82: AhR-Abhängigkeit BaP- und Flavonoid-Effekte auf den mRNA-Spiegel der AKT-Signalwegkomponenten (AKT, PTEN und PI3K) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.

Die Zellen wurden 24 h mit der 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP und je 10 μ M Flavonoid inkubiert, bzw. ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$). (n = 3)

Der basale AKT-mRNA-Spiegel wird in Caco-2-Zellen weder durch BaP und Flavonoide noch durch ihre Kombinationen mit MNF beeinflusst (Abbildung 81). Im Gegensatz hierzu sind deutliche Effekte auf den PTEN-Transkript-Spiegel festzustellen (Abbildung 82). BaP supprimiert den PTEN-mRNA-Spiegel um 34 %. Außer Galangin können die Flavonoide die BaP-medierte Hemmung des PTEN mRNA-Spiegels in Caco-2-Zellen nicht beeinflussen. Bei einer gleichzeitigen AhR-Inhibition kann der PTEN-mRNA-Spiegel jedoch gesteigert werden. Lediglich für Quercetin und Myricetin hebt eine gleichzeitige AhR-Inhibition nicht nur die

Unterdrückung komplett auf, sondern steigert den PTEN-Transkript-Level auch noch um 50 % Quercetin bzw. 20 % Myricetin gegenüber der Kontrolle. Diese Steigerungen sind gegenüber den Kombinationen ohne MNF signifikant (MBQ: $p < 0,001$ // MBM: $p = 0,005$).

Die BaP-vermittelte Steigerung des PI3K-mRNA-Levels wird durch die AhR-Inhibierung in Caco-2-Zellen signifikant aufgehoben ($p = 0,001$). Eine gleichzeitige AhR-Inhibierung führt zu unterschiedlichen Effekten auf den PI3K-mRNA-Spiegel. Durch Quercetin und Myricetin wird der PI3K-mRNA-Spiegel signifikant um 50 % und 27 % abgesenkt (MBQ: $p < 0,001$ // MBM: $p = 0,018$), während für Galangin keine Veränderung auftritt. Jedoch kann Kaempferol eine signifikante Steigerung des PI3K-mRNA-Spiegels in Caco-2-Zellen um 30 % verursachen ($p = 0,018$).

AhR-Abhängigkeit der Induktion der **Nrf2**-Signalweg-Komponenten in Caco-2 Zellen

Für den Nrf2-mRNA-Spiegel sind keine signifikanten BaP- oder Flavonoid-Effekte in Caco-2-Zellen zu ermitteln (Abbildung 83). Auch die Inhibition des AhR zeigt keine signifikanten Auswirkungen auf den Nrf2-mRNA-Spiegel. Die BaP-medierte Steigerung des keap1-mRNA-Spiegels um 25 % kann durch die AhR-Inhibierung in Caco-2-Zellen um 15 % unter Kontrollniveau supprimiert werden ($p = 0,027$). Die Flavonoide selbst haben keinen Effekt auf den keap1-mRNA-Spiegel in Caco-2-Zellen. Jedoch wird dieser in Gegenwart von MNF durch Quercetin und Kaempferol in Caco-2-Zellen signifikant um 58 % bzw. 59 % gegenüber der Kontrolle gesteigert (MQ: $p = 0,006$ // MK: $p = 0,005$).

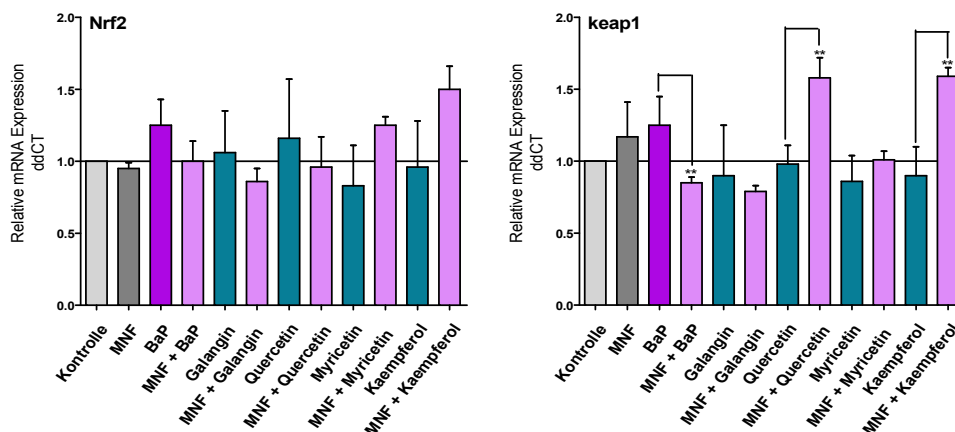


Abbildung 83: AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekten auf den mRNA-Spiegel der Nrf2-Signalwegkomponenten (Nrf2 und Keap1) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR. Die Zellen wurden 24 h mit der Kontrolle (0,1 % DMSO, 3 µM BaP, je 10 µM Flavonoid und 10 µM MNF inkubiert. Die Kombinationen von BaP und Flavonoid wurden in Ko-Inkubation durchgeführt. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$) (n = 3).

Der AhR-Inhibitor MNF führt in den Kombinationen von BaP mit Quercetin und Myricetin zu einer signifikanten Absenkung des Nrf2-mRNA-Spiegels um 24 % bzw. 30 % unter Kontrollniveau in Caco-2-Zellen (MBQ: $p = 0,001$ // MBM: $p = 0,007$) (Abbildung 84).

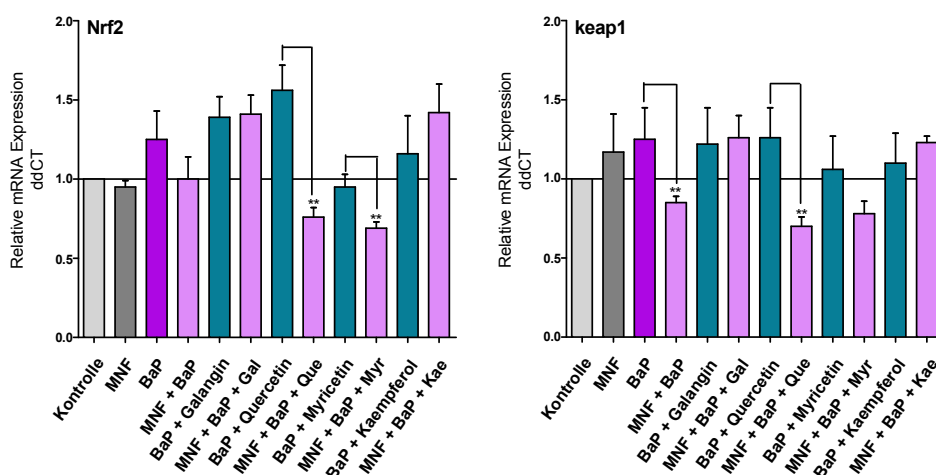


Abbildung 84: AhR-Abhängigkeit BaP- und Flavonoid-Effekte auf den mRNA-Spiegel der Nrf2-Signalwegkomponenten (Nrf2 und Keap1) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR. Die Zellen wurden 24 h mit der 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 µM BaP und je 10 µM Flavonoid inkubiert, bzw. ko-inkubiert. Für die Kombination mit MNF wurde MNF 30 min vorinkubiert. (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$) (n = 3)

Auch bei keap-1 zeigt die Inhibierung des AhR Auswirkungen auf dessen mRNA-Spiegel in Caco-2 Zellen. Die BaP-abhängige Steigerung des keap1-mRNA-Spiegel um 25 % wird durch die AhR-Inhibierung mit MNF signifikant aufgehoben ($p = 0,027$). Bei den Flavonoiden ist lediglich der Effekt der AhR-Inhibierung bei der Kombination mit Quercetin um 44 % als signifikant zu verzeichnen (MBQ: = 0,008). Die Effekte von Flavonoiden und BaP auf den mRNA-Level von keap1 und Nrf2 sind also offenbar AhR-abhängig (Abbildung 84).

6.5 Relevanz der entstehenden BaP-Metabolite bei den BaP-medierten Effekten in Caco-2-Zellen

In den bisher dargestellten Experimenten wurde die Vielfalt an Effekten deutlich, die BaP auf Caco-2-Zellen ausübt, wie die Induktion von DNA-Schäden und Apoptose. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Effekte abhängig vom AhR-Signalweg sind. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Effekte direkt durch BaP ausgelöst werden oder vielmehr durch die gebildeten reaktiven BaP-Metabolite entstehen. Zur Überprüfung dieser These wird β -Naphthoflavon (β -NF) quasi als BaP-Analogon eingesetzt und entsprechend als AhR-Agonist wirkt. Der Unterschied zu BaP ist das Fehlen reaktiver Metabolite beim Einsatz von β -Naphthoflavon. Des Weiteren werden die Inhibitoren MNF und α -Naphthoflavon (α -NF) eingesetzt. Während MNF den Ah-Rezeptor antagonisiert und dadurch das CYP1A1-Protein und entsprechend dessen Aktivität absenkt, Das α -Naphthoflavon (α -NF) inhibiert kompetitiv die enzymatische Aktivität von CYP1A1. Zusätzlich wurden die Auswirkungen auf den Zellzyklus über die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot detektiert.

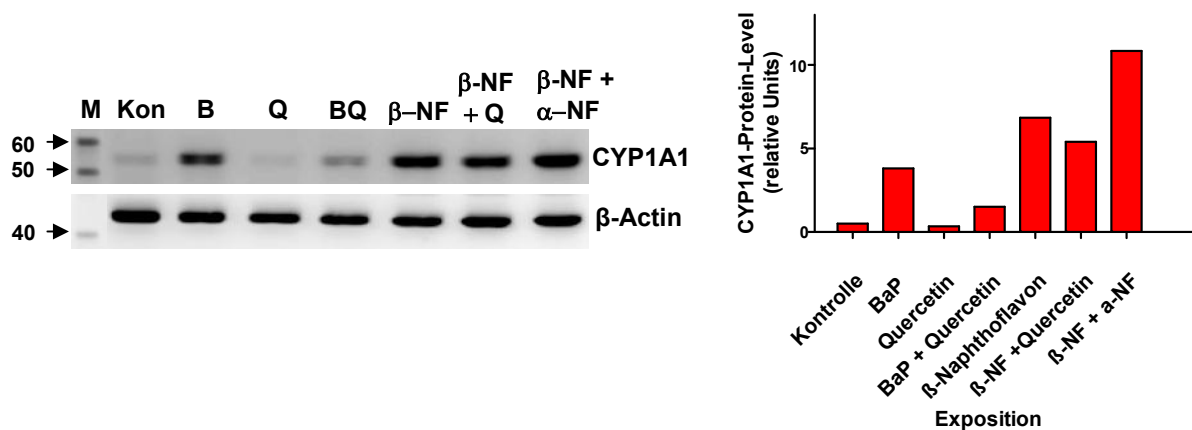
6.5.1 Ermittlung der β -Naphthoflavon-medierten Effekte auf CYP1A1 im

Vergleich zu BaP in Caco-2-Zellen

Zunächst wird die Effektivität von β -Naphthoflavon (β -NF) als AhR-Agonist und BaP-Analogon untersucht. Hierzu wird seine Wirkung auf den CYP1A1-Protein-Level mittels Western-Blot (Abbildung 85) und auf die CYP1A1-Aktivität mittels EROD bestimmt (Abbildung 86).

Einfluss von β -Naphthoflavon auf den CYP1A1-Protein-Level in Caco-2-Zellen im Vergleich zu BaP

Zur Überprüfung, ob β -Naphthoflavon (β -NF) den Proteinlevel des CYP1A1 in Caco-2-Zellen in gleichem Maße wie BaP induzieren kann, wurde eine Western-Blot-Analyse mit Lysaten der behandelten Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 85). Hierzu wurden die Caco-2-Zellen 24 h mit 3 μ M BaP, 10 μ M Quercetin, 10 μ M β -NF, 10 μ M Quercetin + 10 μ M β -NF oder 10 μ M β -NF + 10 μ M α -NF inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet.



a) CYP1A1 Blot

b) CYP1A1 Quantifizierung

Abbildung 85: β -Naphthoflavon als CYP1A1 Induktor im Vergleich zu BaP in Caco-2-Zellen (M: Proteingrößenmarker). a) repräsentativer Blot (n = 3) b) Quantifizierung der CYP1A1 Western-Blot-Banden normiert auf β -Actin. Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, 10 μ M Quercetin, 10 μ M β -NF und 10 μ M α -NF inkubiert bzw. ko-inkubiert.

BaP induziert, wie bereits gezeigt, den CYP1A1-Protein-Level ca. 8-fach gegenüber der Kontrolle in Caco-2-Zellen und das Flavonoid Quercetin verhindert den BaP-medierten Effekt um 75 % (siehe Abbildung 85). Das synthetische Flavonoid, β -Naphthoflavon, welches als Analogon zu BaP als AhR-Agonist eingesetzt wurde, steigert den Protein-Spiegel von CYP1A1 fast 14-fach gegenüber der Kontrolle in Caco-2-Zellen. Da BaP jedoch nur in einer Konzentration von 3 μ M eingesetzt wurde und nicht wie β -NF 10 μ M ist BaP trotzdem der stärkere CYP1A1-Induktor. Das Flavonoid Quercetin kann die BaP-vermittelte Induktion von CYP1A1 nahezu vollständig aufheben (Kontrollniveau). Auch die β -NF-vermittelte Induktion von CYP1A1 in Caco-2-Zellen kann durch Quercetin um 20 % verhindert werden. Bei Aktivierung des AhR-Signalweges durch β -NF und gleichzeitiger Exposition mit dem

CYP1A1-Inhibitor α -NF, zeigt sich eine weitere Steigerung des CYP1A1-Protein-Levels um ca. 60 % gegenüber alleiniger Behandlung mit β -NF in Caco-2-Zellen.

Einfluss von β -Naphthoflavin auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen im Vergleich zu BaP

Der durch β -NF erhöhte CYP1A1-Spiegel sollte sich in einer entsprechend erhöhten Enzymaktivität äußern. Zur Überprüfung wurde ein EROD-Assay durchgeführt. Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP, 10 μ M BaP, 10 μ M β -NF und 10 μ M α -NF inkubiert bzw. ko-inkubiert wie in Abbildung 86 angegeben. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet.

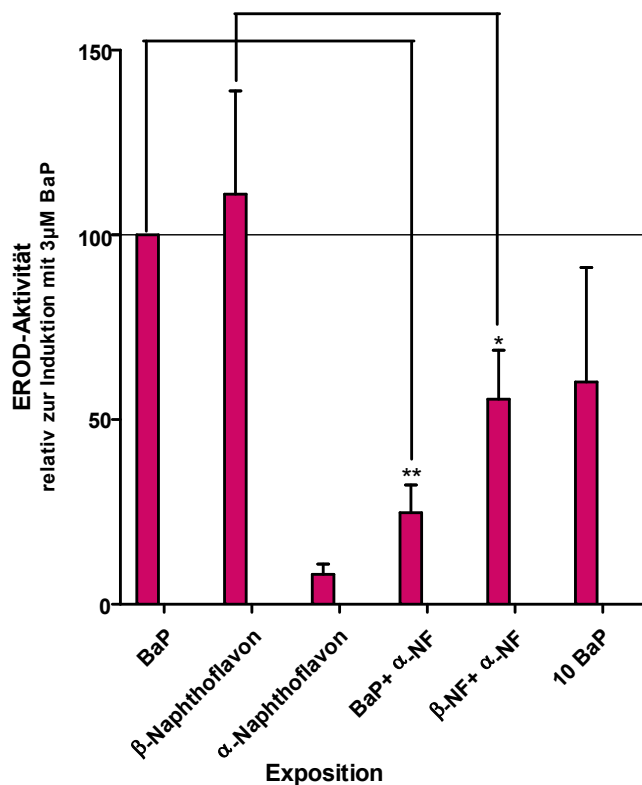


Abbildung 86: Einfluss von β -Naphthoflavin auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen im Vergleich zu BaP (EROD).

Die Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP, 10 μ M β -NF, 10 μ M α -NF und 10 μ M BaP inkubiert bzw. ko-inkubiert. (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

Das β -NF induziert die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen gleichwertig zu BaP. Durch die Inhibition des Enzyms CYP1A1, mittels α -NF, sinken sowohl die durch BaP-induzierten, als auch die durch β -NF-induzierten CYP1A1-Aktivitäten um 75 % bzw. 50 % in Caco-2-Zellen signifikant ab (BaP + α -NF: $p < 0,001$; β -NF + α -NF: $p = 0,036$). α -Naphthoflavin selbst hat keinen Einfluss auf die Induktion der CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen (siehe Abbildung 86).

6.5.2 Einfluss von β -Naphthoflavon auf die Induktion von DNA-Schäden über die Expression von γ H2Ax in Caco-2-Zellen

Es soll überprüft werden, ob das β -NF nicht nur einen Einfluss auf das BaP-metabolisierende Enzym CYP1A1 besitzt (siehe Abbildung 85 & Abbildung 86), sondern auch andere BaP-Effekte in den Caco-2-Zellen imitiert, wie zum Beispiel die Ausbildung von DNA-Schäden.

Die Ausbildung der DNA-Schäden wird über die Induktion der Histon H2A-Isoform γ H2Ax ermittelt. Diese Induktion wird über zwei verschiedene Methoden bestimmt, Immunfluoreszenz (Abbildung 87 & Abbildung 88) und Western-Blot-Analyse (Abbildung 89). Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 3 μ M BaP und 10 μ M β -NF inkubiert. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet.

Wie in Abbildung 87 gezeigt wird, induziert β -NF im Gegensatz zu BaP in Caco-2-Zellen kein γ H2Ax gegenüber den Kontrollen. Auch DMSO zeigt bereits eine leichte Induktion des γ H2Ax.

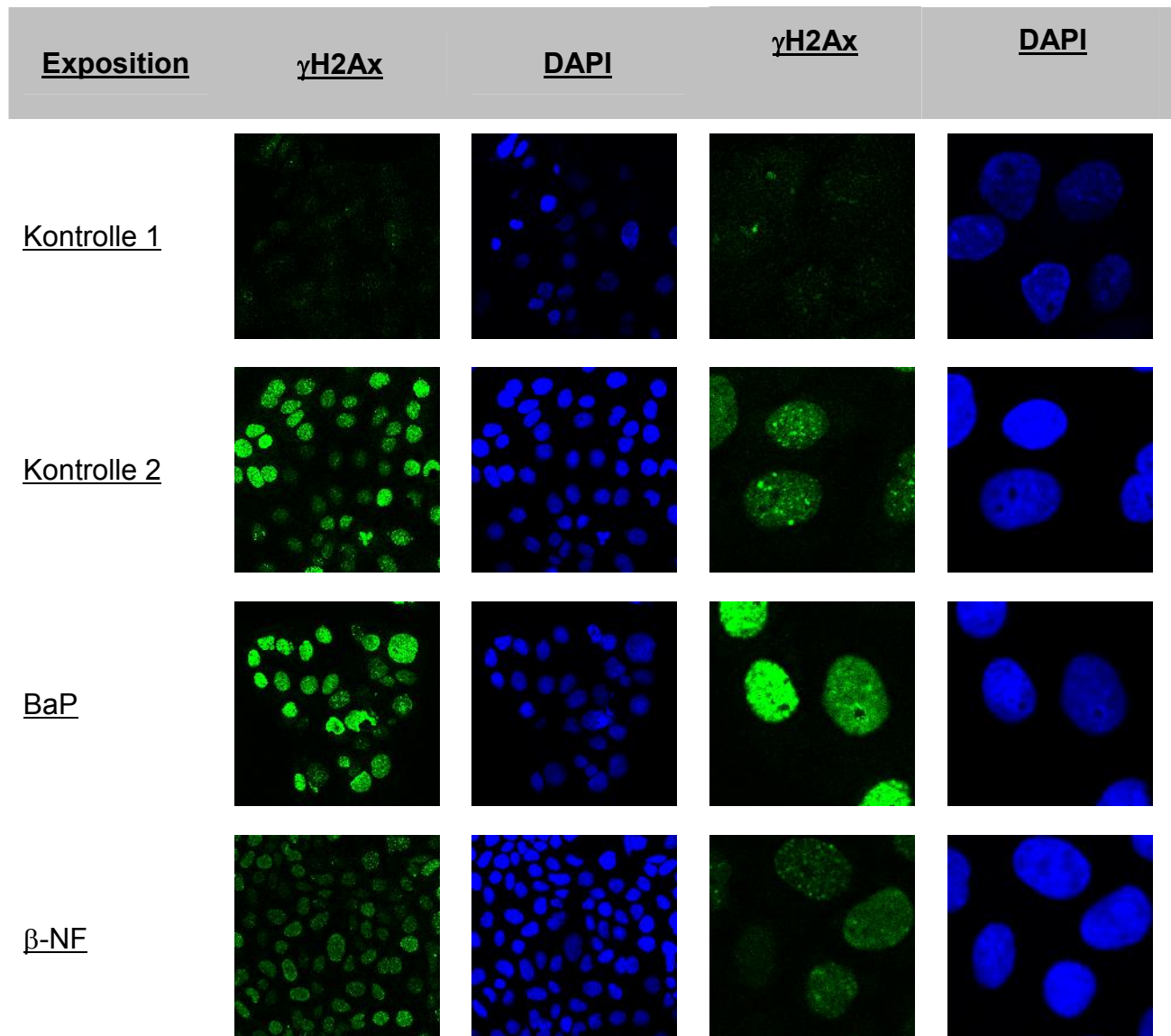


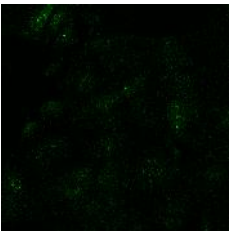
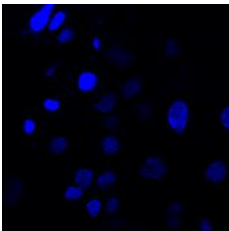
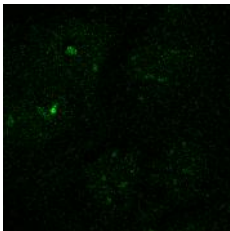
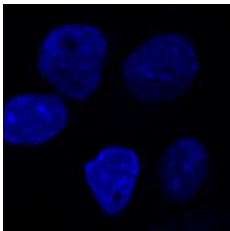
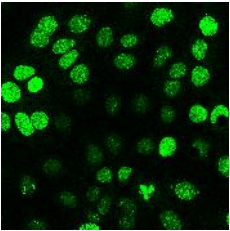
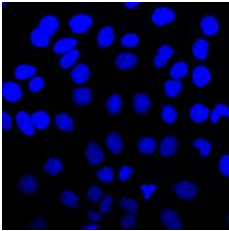
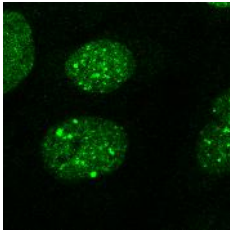
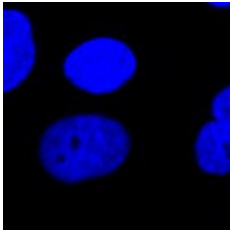
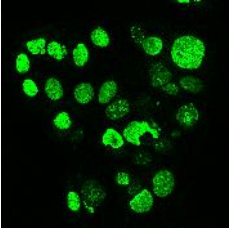
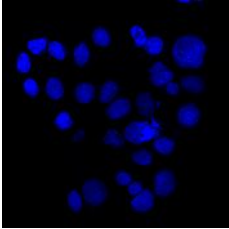
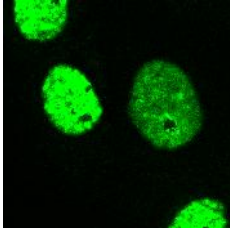
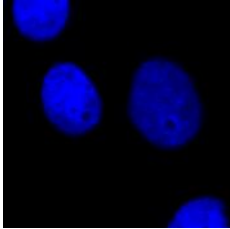
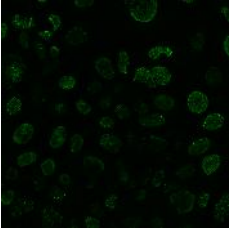
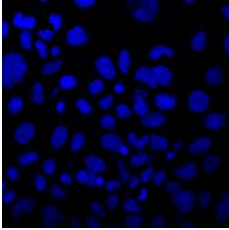
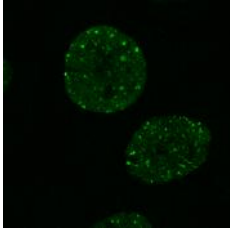
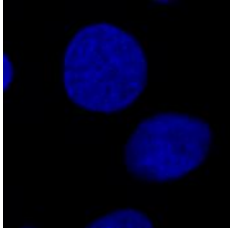
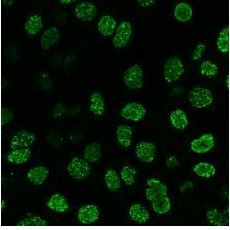
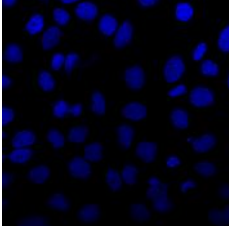
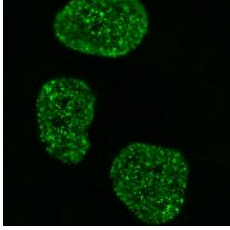
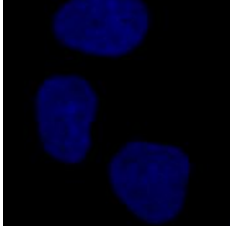
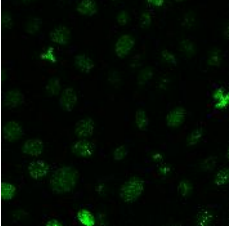
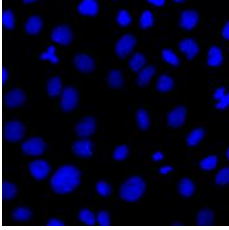
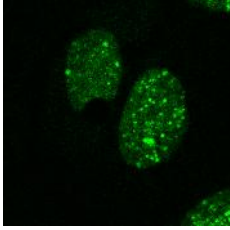
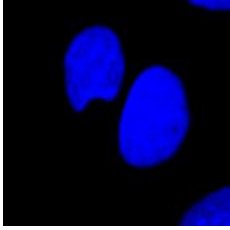
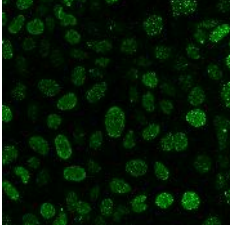
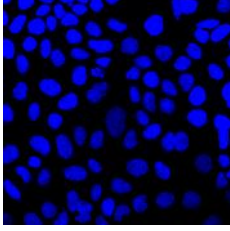
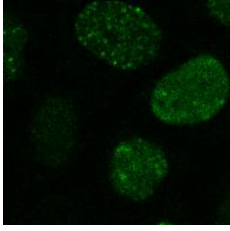
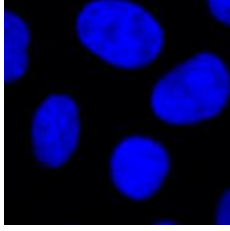
Abbildung 87: Nachweis der Induktion des γ H2Ax-Protein-Spiegels durch BaP oder β -Naphthoflavon in Caco-2-Zellen mittels Immunfluoreszenz.

Die Zellen wurden 24 h mit den 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μ M BaP und 10 μ M β -NF inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle verwendet (Kontrolle 1). Die beiden rechten Bilder sind eine vierfache Vergrößerung der beiden linken Bilder.

Effekte der Inhibierung der Ausbildung reaktiver Metabolite auf die BaP und β -Naphthoflavon induzierte Expression des γ H2Ax Proteins in Caco-2-Zellen

BaP aktiviert den AhR-Signalweg und steigert dadurch die Induktion des CYP1A1, welches dann die Metabolisierung von BaP initiiert und die Umwandlung zu reaktiven BaP-Metaboliten fördert. Die Entstehung solcher Metabolite kann entweder über die Inhibierung des AhR mittels MNF verhindert werden, da die Induktion des CYP1A1 dadurch unterbunden wird, oder durch die Verwendung von β -NF, welches CYP1A1 zwar induziert, aber selbst nicht metabolisiert werden kann. Des Weiteren kann die

CYP1A1-Aktivität durch α -NF inhibiert werden. Es wurden entsprechende Expositionsexperimente mit Caco-2-Zellen durchgeführt und anschließend die Ausbildung von DNA-Schäden über die Induktion des γ H2Ax in der Immunfluoreszenz (siehe Abbildung 88) und im Western-Blot (Abbildung 89) analysiert. Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μ M BaP, 10 μ M β -NF, 10 μ M α -NF und 10 μ M MNF inkubiert bzw. ko-inkubiert. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle 1 bezeichnet.

Exposition	γ H2Ax	DAPI	γ H2Ax	DAPI
Kontrolle 1				
Kontrolle 2				
BaP				
BaP + MNF				
MNF				
α -NF				
β -NF				

β -NF + α -NF

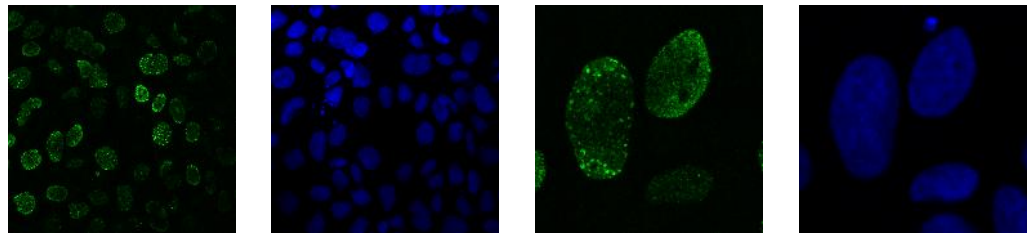


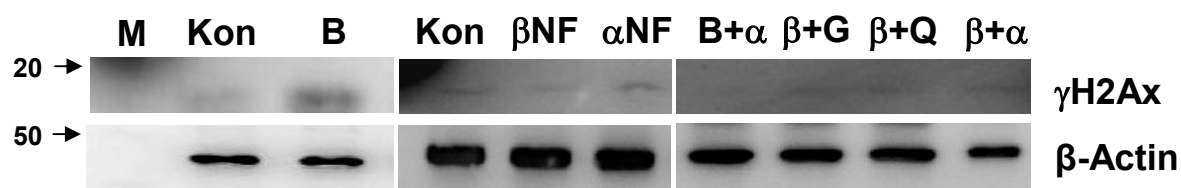
Abbildung 88: Nachweis der Induktion der γ H2Ax-Expression durch BaP oder β -Naphthoflavon in Caco-2-Zellen nach Hemmung der Ausbildung reaktiver Metabolite mittels Immunfluoreszenz.

Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μ M BaP, 10 μ M β -NF, 10 μ M α -NF und 10 μ M MNF inkubiert bzw. ko-inkubiert. MNF inhibiert den AhR und somit die Induktion des metabolisierenden Enzyms CYP1A1. α -NF inhibiert direkt die Proteinaktivität des CYP1A1. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle (1) verwendet. Die beiden rechten Bilder sind eine vierfache Vergrößerung der beiden linken Bilder.

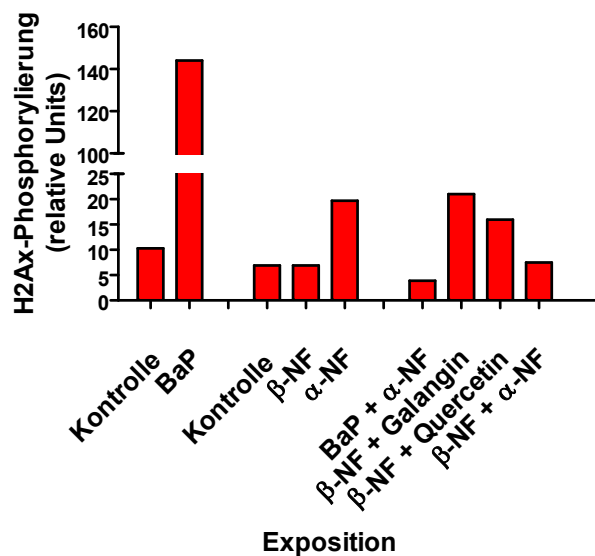
Durch die Inhibition des AhR mit MNF kann die BaP-vermittelte Induktion des γ H2Ax in Caco-2-Zellen vollständig zurückgesetzt werden. Das heißt, dass die BaP-medierte Induktion von γ H2Ax in Caco-2-Zellen AhR abhängig ist. Der AhR-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf die Induktion von γ H2Ax in Caco-2-Zellen, genauso wie der CYP1A1-Inhibitor α -NF. β -NF zeigt keine Induktion des γ H2Ax in Caco-2-Zellen. Die Inhibierung von CYP1A1 mittels α -NF bei gleichzeitiger Exposition mit β -Naphthoflavon bewirkt keine γ H2Ax-Induktion.

BaP zeigt in der Immunfluoreszenz bereits eine Induktion des γ H2Ax (siehe Abbildung 88) und auch im Western-Blot ist eine starke Induktion des γ H2Ax in Caco-2-Zellen mit einer ca. 15-fachen Steigerung gegenüber der Kontrolle detektierbar, während das als BaP eingesetzte Analogon β -NF keine γ H2Ax-Induktion in Caco-2-Zellen bewirkt (siehe Abbildung 89).

Die Kombination von β -NF und Flavonoiden (G&Q) steigert deutlich die γ H2Ax-Induktion um 200 % bzw. 130 % gegenüber alleiniger β -NF-Inkubation in Caco-2-Zellen. Der CYP1A1-Inhibitor α -NF steigert bereits alleine die γ H2Ax-Induktion um 185 % gegenüber der Kontrolle in Caco-2-Zellen. Eine BaP-vermittelte Induktion des γ H2Ax wird aber durch die Inhibierung der CYP1A1-Aktivität mittels α -NF nahezu komplett verhindert (97 %). β -NF hat auch in Kombination mit α -NF keinen Effekt auf die γ H2Ax-Induktion in Caco-2-Zellen. Somit ist die BaP-medierte Induktion des γ H2Ax in Caco-2-Zellen offenbar abhängig von der Entstehung reaktiver BaP-Metabolite (Abbildung 88).



a) γ H2Ax Blot



b) γ H2Ax Quantifizierung

Abbildung 89: Einfluss von BaP oder β -NF auf den γ H2Ax-Protein-Level in Caco-2-Zellen in Gegenwart des CYP1A1-Inhibitors α -NF.

a) repräsentativer Western-Blot (M: Proteingrößen-marker). b) Quantifizierung der γ H2Ax Western-Blot-Banden normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle), 3 μ M BaP, 10 μ M β -NF, 10 μ M α -NF und 10 μ M Quercetin inkubiert bzw. ko-inkubiert.

6.5.3 Einfluss von β -Naphthoflavin auf die Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen

Das β -NF kann zwar wie BaP die Induktion des CYP1A1 in Caco-2-Zellen steigern (siehe Abbildung 85), wird aber anschließend nicht wie BaP über das CYP1A1 metabolisiert. Daher kommt es zu keiner Ausbildung reaktiver Metabolite. Um zu überprüfen, ob die BaP-medierte Effekte auf die Apoptose in Caco-2-Zellen (6.2.2) auf die entstehenden reaktiven Metabolite zurückzuführen sind wurde β -NF als BaP-Analogon bei der Induktion der Apoptose verwendet. Hierfür werden zunächst FACS-Analysen zur generellen Induktion der Apoptose durchgeführt (siehe Abbildung 90) und der Einfluss der Flavonoide auf eventuelle Effekte getestet (siehe Abbildung 91). Des Weiteren werden die Veränderungen des Protein-Spiegel der Apoptosemarker Bax und Bcl-2 im Western-Blot ermittelt (siehe Abbildung 92). Zusätzlich wird der Einfluss der Metabolite auf die Caspase-3 Aktivität in Caco-2-Zellen untersucht (siehe Abbildung 94).

Vergleich der Apoptose-Induktion durch β -Naphthoflavin und BaP in Caco-2-Zellen

Wie in Abbildung 90 gezeigt wird, induziert BaP (3 μ M) in Caco-2-Zellen die Apoptose signifikant um 170 % gegenüber der Kontrolle ($p = 0,02$). Auch β -Naphthoflavin (10 μ M) bewirkt eine solche Induktion, die ebenfalls signifikant jedoch mit einer nur 50%igen Steigerung gegenüber der Kontrolle deutlich geringer ist als mit BaP ($p = 0,031$).

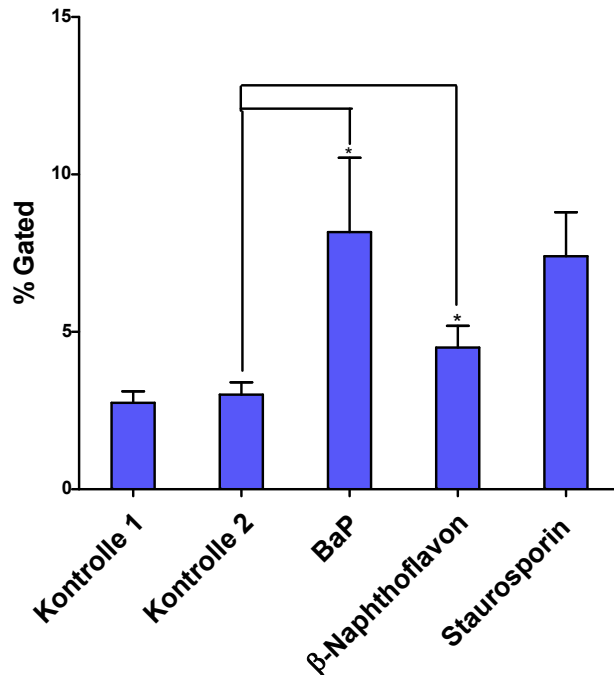


Abbildung 90: Nachweis der Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen durch β -NF mittels FACS-Analyse.

Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μ M BaP, 10 μ M β -NF und 1 μ M Staurosporin inkubiert. Staurosporin wurde als Positivkontrolle für die Induktion der Apoptose eingesetzt. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle verwendet (Kontrolle1) (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$) ($n=3$)

Vergleich der Flavonoideffekte auf die β -Naphthoflavon- und BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen

Wie bereits in 6.3.2 gezeigt wurde kann Quercetin die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen komplett aufheben ($p < 0,001$) senken. In Kombination mit β -NF ist dieser Effekt nicht zu sehen. Im Gegenteil, führt eine ko-Exposition mit Quercetin in Caco-2-Zellen sogar zu einer 2,5-fachen ($p = 0,008$) Steigerung der β -NF-induzierten Apoptose (siehe Abbildung 91).

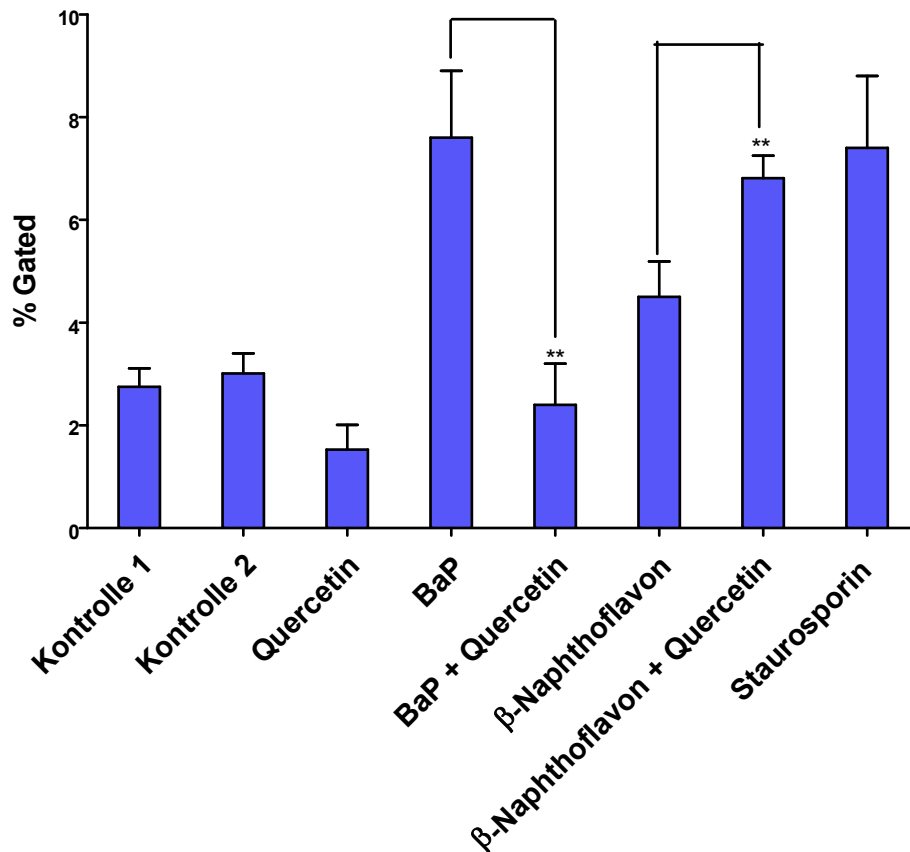


Abbildung 91: Ermittlung von Flavonoidwirkungen auf die β -Naphthoflavon-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen im Vergleich zur Wirkung auf BaP-Effekte mittels FACS-Analyse. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μ M BaP, 10 μ M β -NF, 10 μ M Quercetin und 1 μ M Staurosporin inkubiert bzw. ko-inkubiert. Staurosporin wurde als positiv Kontrolle für die Induktion der Apoptose eingesetzt. Als zusätzliche Kontrolle (1) wurden unbehandelte Zellen eingesetzt. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

Effekt der Inhibierung des BaP metabolisierenden Enzyms CYP1A1 auf die BaP und β -Naphthoflavon induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen

Wie bereits gezeigt werden konnte (6.4.2)., wird durch die Inhibition des AhR die BaP-medierte Induktion der Apoptose um 85 % aufgehoben oder wie in diesem Versuch komplett aufgehoben ($p = 0,017$) in Caco-2-Zellen (Abbildung 92). Durch die AhR-Inhibition wird auch der CYP1A1-Protein-Spiegel vermindert und in Folge dessen auch die CYP1A1-Aktivität. Deswegen entstehen bei einem inaktiven AhR-Signalweg keine reaktiven Metabolite des BaP. Bei einer gleichzeitigen Exposition des CYP1A1-Inhibitors mit BaP, wird die BaP-vermittelte Apoptose signifikant um 88 % ($p = 0,034$) in Caco-2-Zellen unterbunden (siehe Abbildung 92). Hieraus schließen wir, dass die BaP-vermittelte Apoptose in Caco-2-Zellen durch die Entstehung reaktiver BaP-Metabolite hervorgerufen wird.

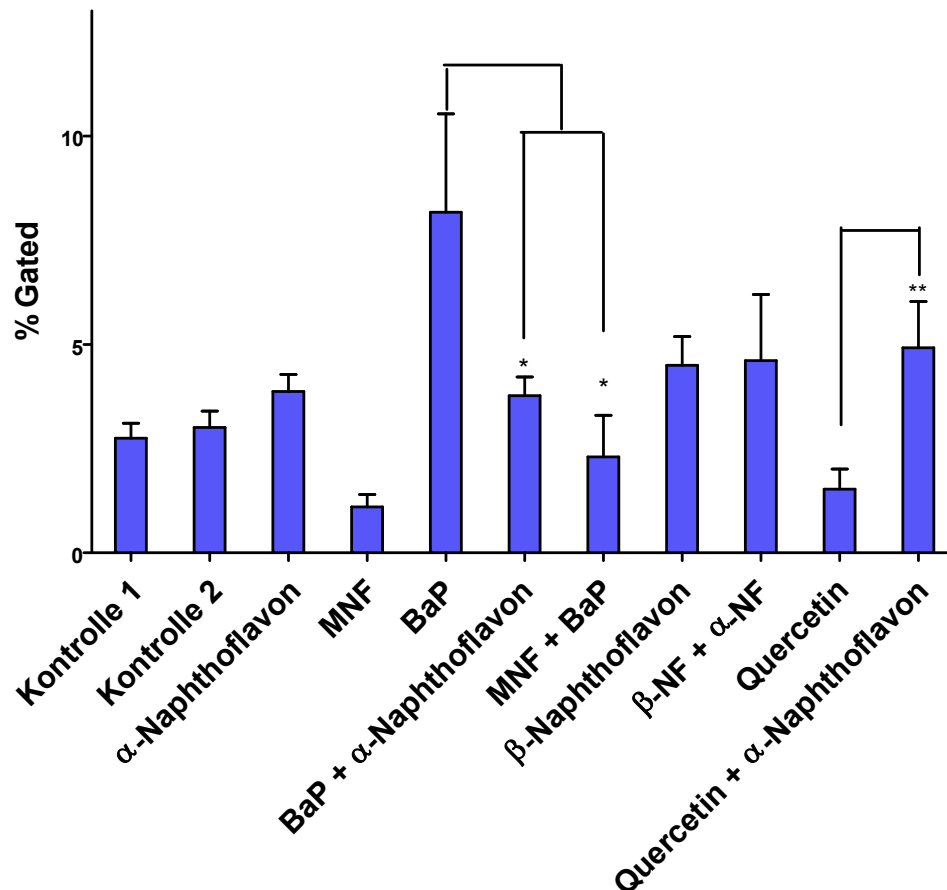
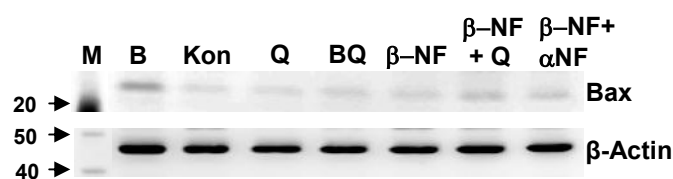


Abbildung 92: Effekte des AhR-Inhibitors MNF und des CYP1A1-Inhibitors α -NF auf die durch BaP, β -NF und Quercetin modulierte Apoptose in Caco-2-Zellen. Die Effekte wurden mittels FACS analysiert. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μ M BaP, 10 μ M β -NF, 10 μ M Quercetin, 10 μ M MNF und 10 μ M α -NF inkubiert bzw. ko-inkubiert. Als zusätzliche Kontrolle (1) wurden unbehandelte Zellen eingesetzt. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) ($n = 3$)

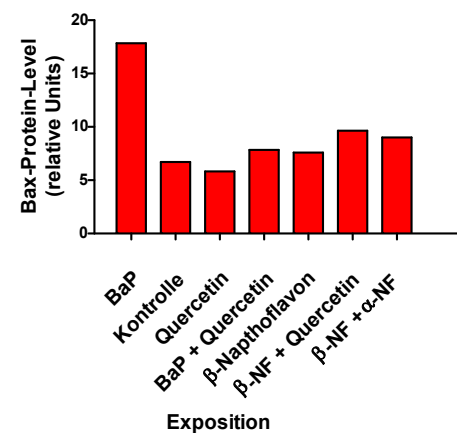
Die β -Naphthoflavon-vermittelte Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen wird bei der direkten Inaktivierung der CYP1A1-Aktivität, mittels α -NF, nicht verändert. Das Flavonoid Quercetin löst selbst keine Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen aus, steigert sie aber bei gleichzeitiger Inaktivierung der CYP1A1-Aktivität durch α -NF signifikant um 27 % ($p = 0,008$) (siehe Abbildung 92).

Vergleich der β -Naphthoflavon- und BaP-induzierten Expression der Apoptosemarker Bax und Bcl-2 in Caco-2-Zellen

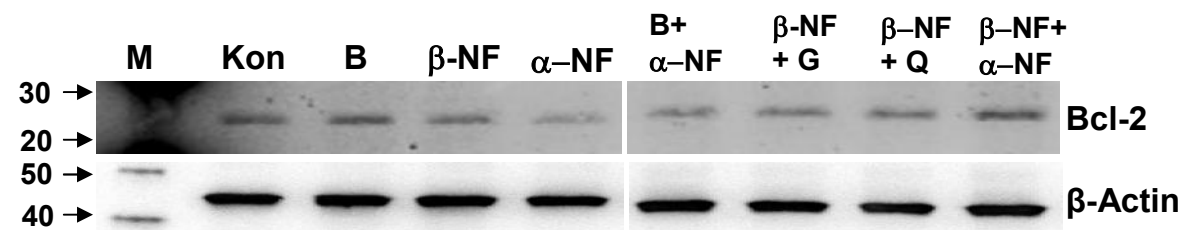
β -Naphthoflavon kann weder alleine, noch in Kombination mit Quercetin oder dem CYP1A1-Inhibitor α -NF das pro-apoptotische Protein Bax in Caco-2-Zellen vergleichbar zu BaP zu induzieren (siehe Abbildung 93). BaP induziert Bax um 166 % und Quercetin kann diese Induktion in Caco-2-Zellen komplett aufheben.



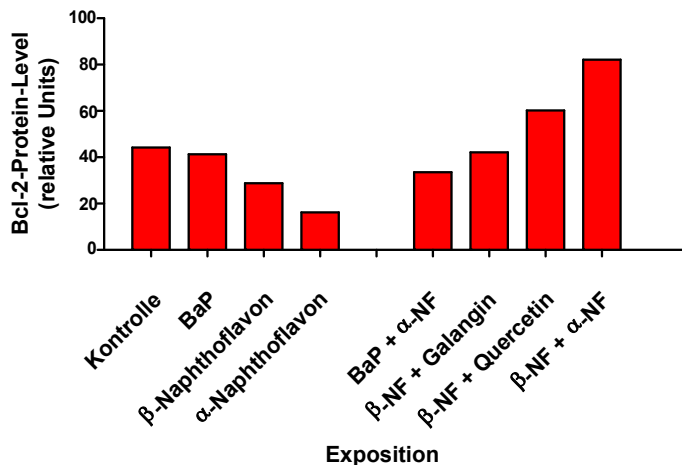
a) Bax Blot



b) Bax Quantifizierung



c) Bcl-2 Blot



d) Bcl-2 Quantifizierung

Abbildung 93: Effekte von BaP und β -NF auf die Spiegel der Apoptose-relevanten Proteine Bax und Bcl-2 unter dem Einfluss des CYP1A1-Inhibitors α -NF sowie der Flavonoide Quercetin und Galangin

a,c) Repräsentative Western-Blots ($n = 3$) (M: Proteingrößenmarker). b,d) Quantifizierung der Bax und Bcl-2 Western-Blot-Banden normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h 0,1 % DMSO (Kontrolle 1), 3 μ M BaP, 10 μ M α -NF, 10 μ M β -NF und je 10 μ M der Flavonoide Galangin und Quercetin inkubiert bzw. ko-inkubiert.

Die Induktion des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 wird durch BaP nicht beeinflusst, während β -NF eine Hemmung des Proteins um 35 % gegenüber der Kontrolle in Caco-2-Zellen hervorruft. Die Flavonoide Galangin und Quercetin sowie der CYP1A1-Inhibitor α -NF können die β -NF-induzierte Suppression des Bcl-2-Proteins in Caco-2-Zellen aufheben (Galangin), bzw. steigern diese um 36 % und 85 % gegenüber der Kontrolle.

Vergleich des β -Naphthoflavon- und BaP-Effektes auf die Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen + Einfluss der CYP1A1-Aktivität auf die Caspase-3-Aktivität

Die BaP-vermittelte Steigerung der Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen kann durch die Inhibition des AhR, und damit indirekt auch des CYP1A1, signifikant ($p = 0,004$)

um 94 % abgesenkt und damit fast gänzlich aufgehoben werden (siehe Abbildung 94). Auch die direkte Inhibierung des CYP1A1 führt zu einer Verminderung der BaP-medierten Steigerung der Caspase-3-Aktivität um 35 % ($p = 0,06$) (siehe Abbildung 94).

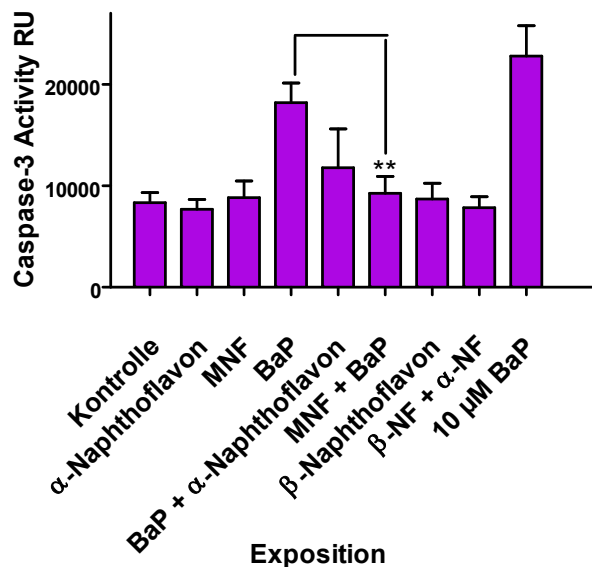


Abbildung 94: Effekte von BaP, β -NF und α -NF auf die Induktion der Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen.

Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO, 3 μ M BaP, 10 μ M β -NF, 10 μ M α -NF und 10 μ M BaP inkubiert bzw. ko-inkubiert. 10 μ M BaP wurde als Positiv-Kontrolle der Caspase-3-Aktivität verwendet. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$) ($n = 3$)

Die Caspase-3-Aktivität wird in Caco-2-Zellen durch β -NF nicht beeinflusst und auch die gleichzeitige Hemmung des CYP1A1 mit α -NF zeigt hierauf keine Auswirkungen.

6.5.4 Relevanz von reaktiven Metaboliten auf Zellzyklus-Effekte in Caco-2-

Zellen

Als Parameter für Effekte auf den Zellzyklus wurde der Phosphorylierungs-Status des Retinoblasoma-Proteins (pRb) gewählt. Eine Phosphorylierung des Rb-Proteins führt zu einer Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, welcher den Übergang der Zellen von der S- zur G1-Phase ermöglicht.

Vergleich der Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins in Caco-2-Zellen durch β -Naphthoflavon oder BaP

Wie aus Abbildung 95 ersichtlich, ist sowohl BaP als auch β -NF in der Lage die Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen zu induzieren.

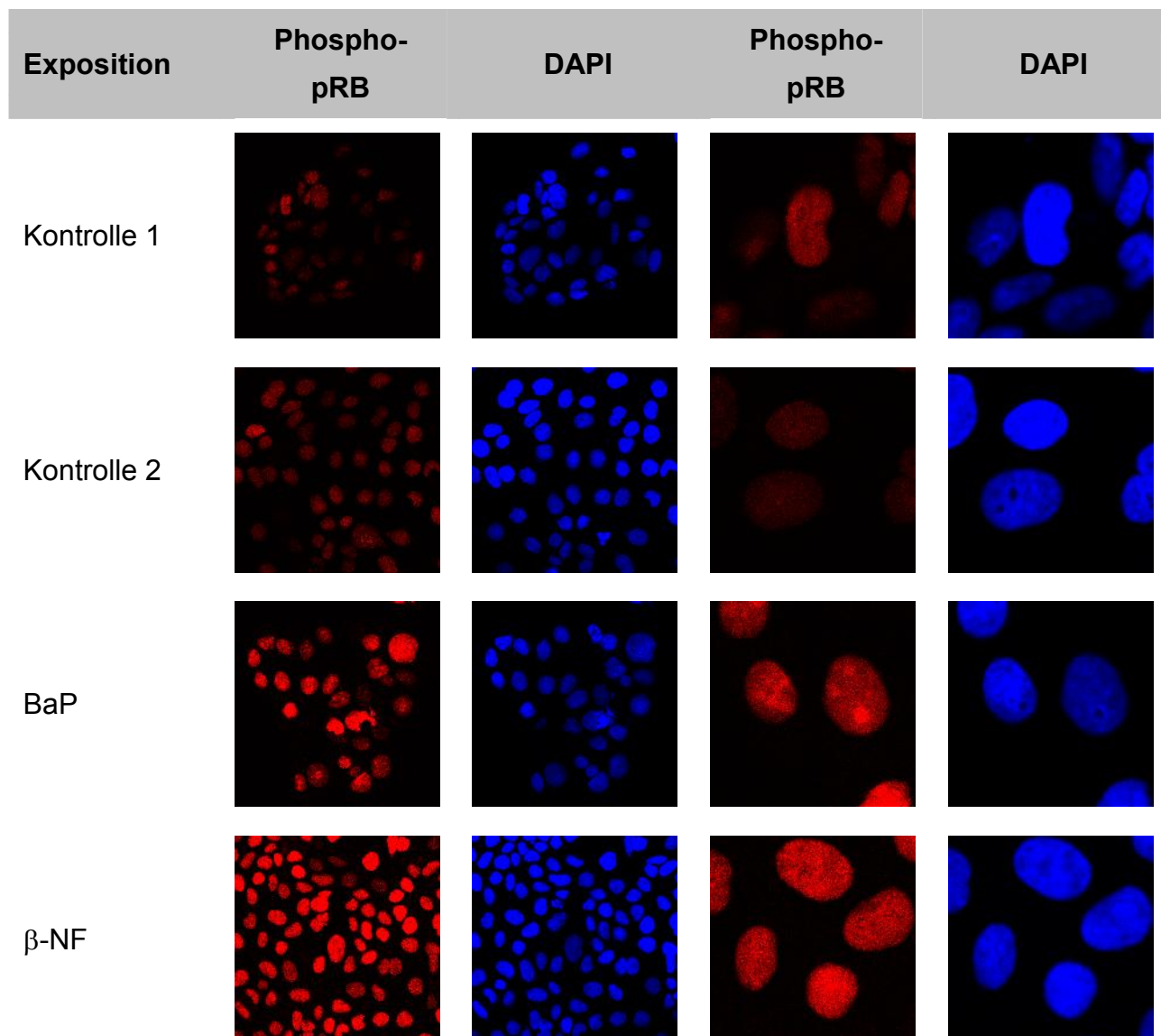
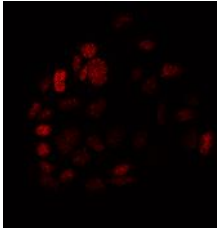
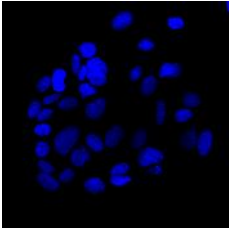
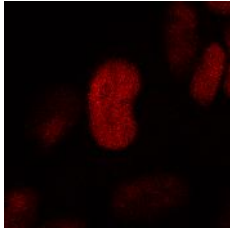
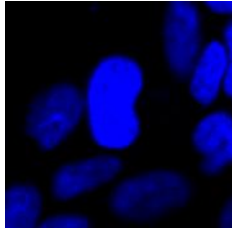
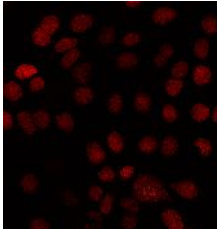
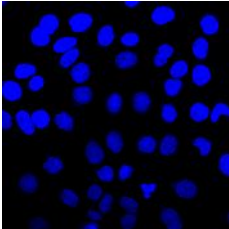
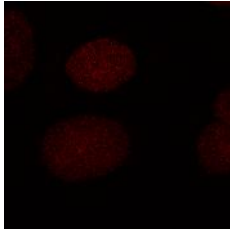
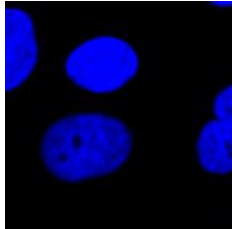
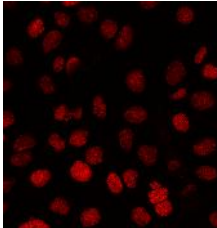
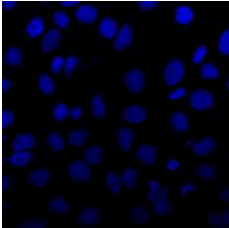
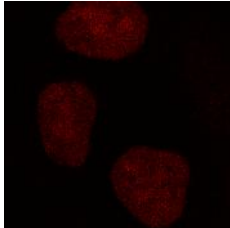
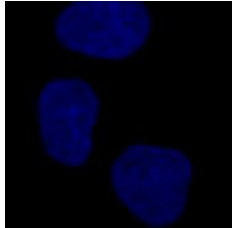
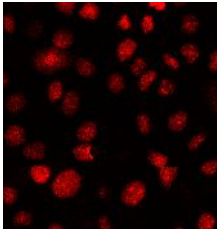
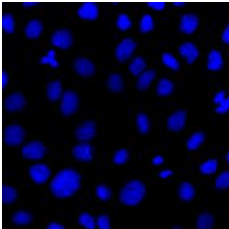
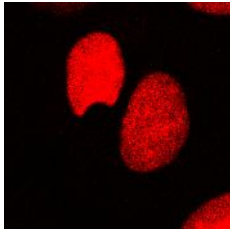
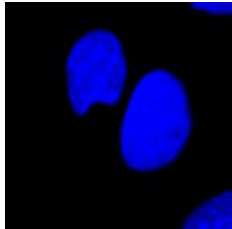
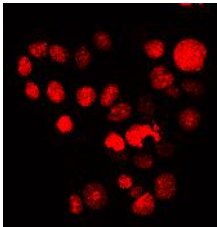
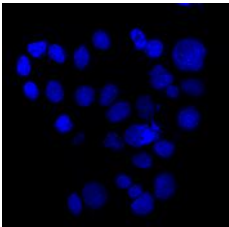
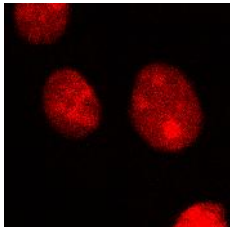
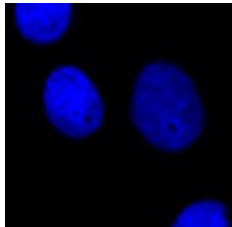
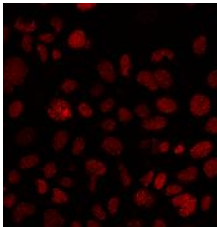
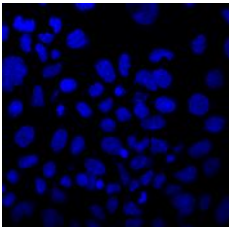
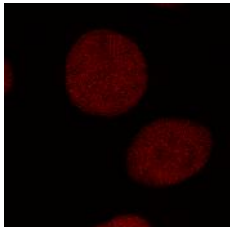
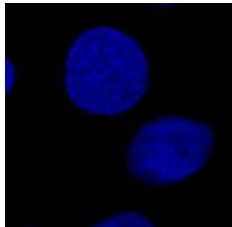


Abbildung 95: Nachweis des Phospho-Rb-Proteins in BaP- und β -NF-behandelten Caco-2-Zellen mittels Immunfluoreszenz.

Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (Kontrolle 2), 3 μ M BaP und 10 μ M β -NF inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle verwendet (Kontrolle 1). Die beiden rechten Bilder sind eine vierfache Vergrößerung der beiden linken Bilder.

Effekte von AhR- und CYP1A1-Inhibitoren auf die BaP- und β -Naphthoflavon induzierte Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins in Caco-2-Zellen

Wie in Abbildung 96 deutlich wird kann die BaP-vermittelte Induktion der pRb-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen durch die Inhibierung des AhR und der dadurch ausbleibenden CYP1A1 Induktion unterbunden werden.

Exposition	Phospho-pRB	DAPI	Phospho-pRB	DAPI
Kontrolle 1				
Kontrolle 2				
MNF				
α -NF				
BaP				
BaP + MNF				

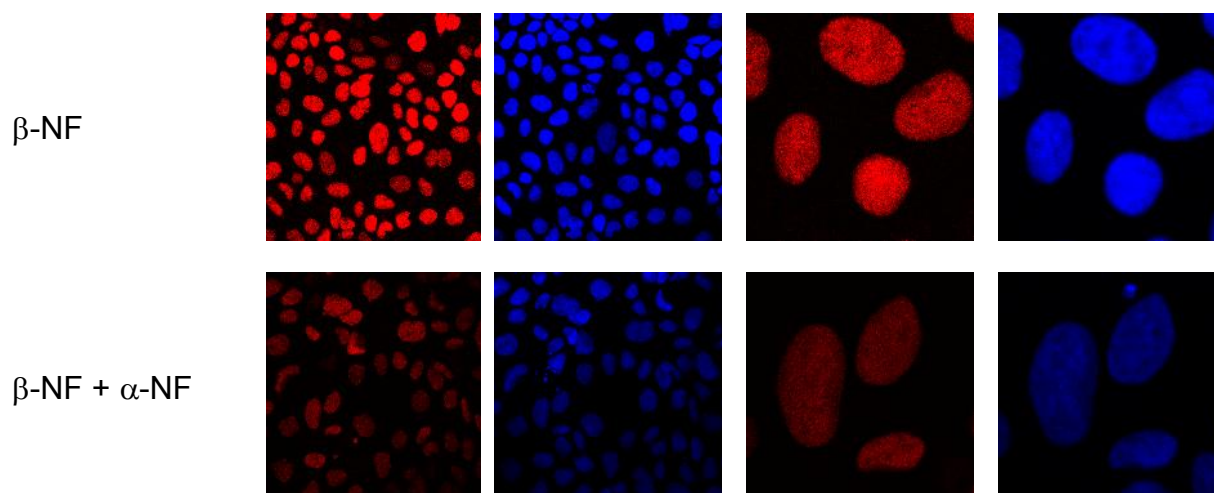
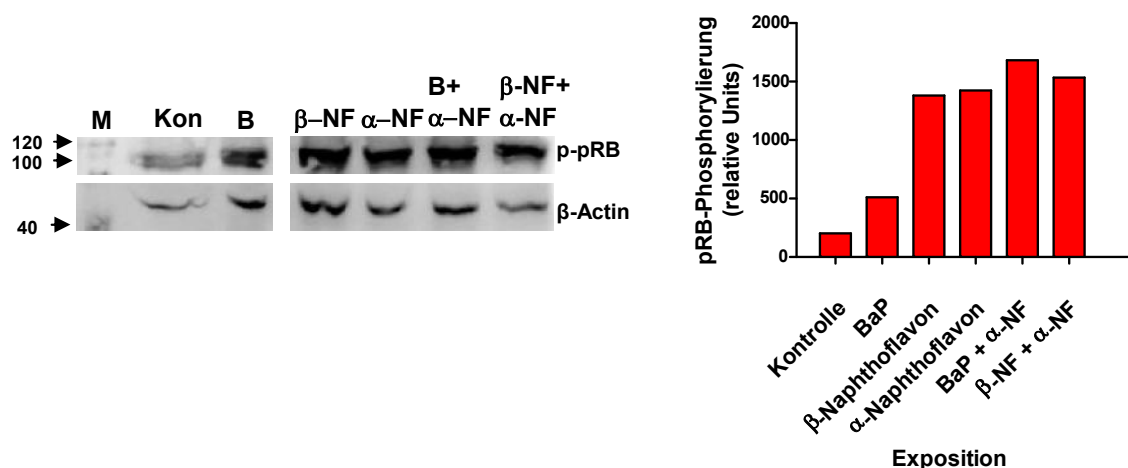


Abbildung 96: Effekt von BaP und b-NF auf die pRb-Phosphorylierung in Gegenwart eines AhR- oder CYP1A1-Inhibitors.

Der Nachweis von Phospho-pRb erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO (2), 3 μ M BaP, 10 μ M β -NF, 10 μ M α -NF und 10 μ M MNF inkubiert bzw. ko-inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle (1) verwendet. Die beiden rechten Bilder sind eine vierfache Vergrößerung der beiden linken Bilder.

Der CYP1A1-Inhibitor, α -NF, kann die β -NF-vermittelte Induktion der pRb-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen ebenfalls unterbinden. Allerdings induziert α -NF selbst die Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen (siehe Abbildung 96). Diese Ergebnisse werden durch eine Western-Blot-Analyse unterstützt (siehe Abbildung 97). BaP induziert die Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen, während β -NF und α -NF diese zweifach stärker als BaP induzieren.



a) phospho-pRB Blot

b) phospho-pRB Quantifizierung

Abbildung 97: Effekte von BaP, β -NF, α -NF und Effekte durch die Inhibierung von CYP1A1 durch α -NF auf die Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen.

a) repräsentativer Western Blot (M: Proteingrößenmarker). b) Quantifizierung der phospho-pRb Western-Blot-Banden, normiert auf β -Actin. Die Zellen wurden 24 h mit 0,1 % DMSO, 3 μ M BaP, 10 μ M β -NF und 10 μ M α -NF inkubiert bzw. ko-inkubiert.

In Abbildung 97 wird gezeigt, dass die Inhibition des CYP1A1 und der gleichzeitigen Exposition mit BaP zu einer weiteren Verstärkung der Rb-Protein-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen führt. Dieser Effekt ist auch marginal mit β -NF zu sehen. Der Rückgang der pRb-Phosphorylierung durch α -NF, wie es in der Immunfluoreszenz sichtbar war (siehe Abbildung 96), ist im Western-Blot nicht bestätigt worden.

6.6 Einfluss von Flavonoiden auf die Bildung und Umwandlung

reaktiver Molekülspezies

Bildung und Spiegel reaktiver Molekülspezies können durch Flavonoide in Zellen nicht nur über die transkriptionelle Regulation entsprechender Enzyme, wie CYP1A1, beeinflusst werden. Bei einer Wechselwirkung zwischen Flavonoid und Enzym kann die enzymatische Aktivität direkt betroffen sein. Eine Inhibierung von CYPs würde die Kapazität der Zelle zur Ausbildung reaktiver Metabolite vermindern. Auch in Bezug auf oxidativen Stress und die Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies gehen die Fähigkeiten von Flavonoiden über ihren Einfluss auf die Expression relevanter Phase II-Enzyme, wie GST, hinaus, indem sie als Radikalfänger direkt mit den ROS reagieren können, die unter anderem auch durch die Aktivität von CYP-Enzymen entstehen. Aus diesem Grunde wurden der Einfluss der verwendeten Flavonoide auf die CYP1A1-Aktivität sowie ihre Radikalfänger-Eigenschaften näher untersucht.

6.6.1 Hemmung der CYP1A1-abhängigen EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen durch Flavonoide

Zur Bestimmung des CYP1A1-Aktivität-Hemmpotentials der Flavonoide wurden die Zellen zunächst für 24 h mit BaP behandelt, um eine Induktion des CYP1A1 zu erreichen. Danach wurde die EROD-Aktivität in Gegenwart verschiedener Flavonoide fluoreszenzfotometrisch bestimmt. Hierzu wurden die Flavonoide in unterschiedlichen Konzentrationen mit den Zellen für 90 min vorinkubiert und dann Reaktionskinetiken über 75 min aufgenommen. Aus den Anfangssteigungen (Abbildung 98 a) wurden über eine Kalibrierung mit dem Reaktionsprodukt Resorufin und eine Proteinbestimmung die spezifischen Aktivitäten berechnet. Abbildung 98 zeigt die Hemmung der EROD-Aktivität durch die vier in dieser Arbeit näher untersuchten Flavonoide sowie zusätzlich von Chrysin, dessen ausgeprägter hemmender Effekt auf CYP1A1 schon in der Literatur beschrieben wurde (Siess et al. 1990, Kim et al.

2005). Während Myricetin und Kaempferol keine oder allenfalls eine nur schwache Hemmwirkung besitzen, ist sie für Galangin, Quercetin und insbesondere für Chrysin deutlich.

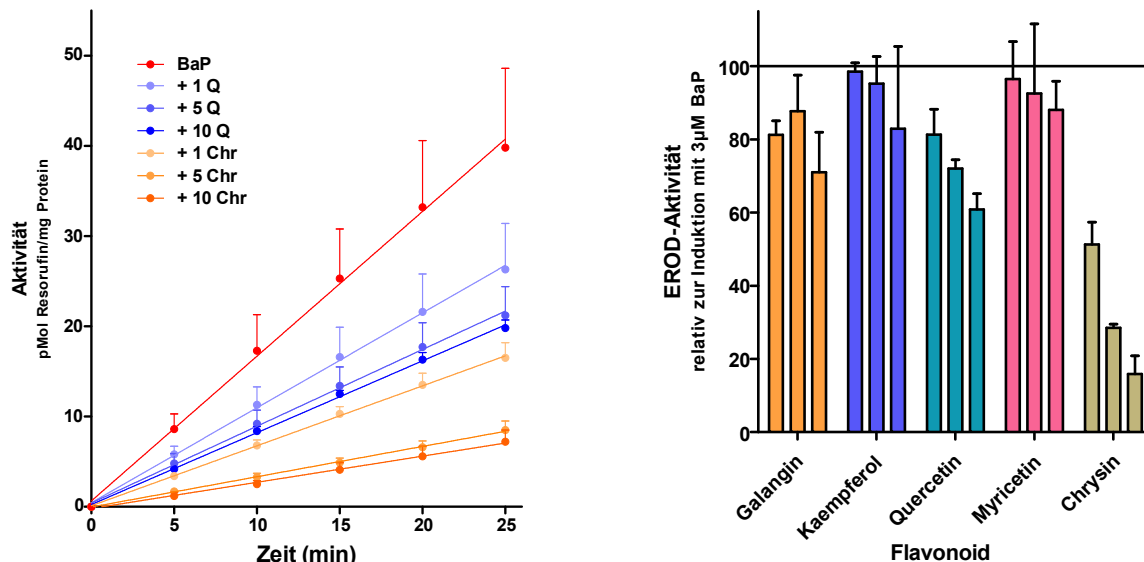


Abbildung 98: Hemmung der CYP1A1-abhängigen EROD-Aktivität durch Flavonoide in BaP-behandelten Caco-2-Zellen.

Die Caco-2-Zellen wurden zur CYP1A1-Induktion 24 h mit BaP vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturen mit den Flavonoiden in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µM (von links nach rechts) versetzt und für 90 min exponiert. Danach wurde das Medium gegen die Reaktionslösung mit dem Substrat Ethoxyresorufin ausgetauscht und eine Reaktionskinetik über 75 min in Zeitintervallen von 5 min aufgenommen. Die Aktivitäten wurden aus den Anfangssteigungen (a) durch Kalibrierung mit Resorufin, dem Produkt der enzymatischen Reaktion, und Normierung auf Gesamtprotein errechnet. Die Aktivität der ungehemmten Proben wurde als Bezugswert mit 100% festgelegt. (a) Darstellung der Anfangssteigungen am Beispiel der ungehemmten Probe (BaP) und der mit Quercetin und Chrysin gehemmten Proben. (b) Gehemmte Aktivitäten in % der ungehemmten Probe.

Um das Hemmpotenzial von Galangin noch genauer zu erfassen, haben wir seine Hemmwirkung in Caco-2-Zellen mit verschieden hoher CYP1A1-Induktion untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen BaP-Konzentrationen im Bereich zwischen 1 und 40 µM behandelt und dann jeweils die Hemmung durch 0,1 µM Galangin bestimmt (siehe Abbildung 99).

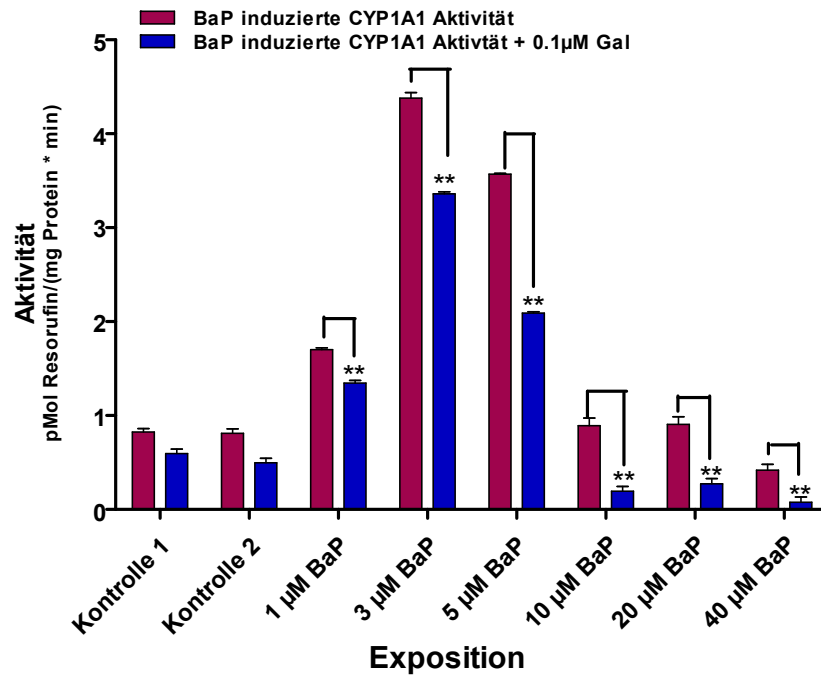


Abbildung 99: Hemmung der BaP-induzierten CYP1A1 Aktivität in Caco-2-Zellen (EROD). Die Caco-2-Zellen wurden 24 h mit BaP und und 0,1 % DMSO (Kontrolle 2) inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als weitere Kontrolle (1) verwendet. Anschließend wurde das BaP Inkubationsmedium entfernt und gut ausgewaschen (1,5 h mit Medium) und jeweils zu den BaP-behandelten Zellen 0,1 µM Galangin zugegeben.

BaP steigert die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen konzentrationsabhängig bis zu 5-fach bei einer Konzentration von 3 µM. Bei höheren BaP-Konzentrationen nimmt die Induktionswirkung wieder ab. Unabhängig von der eingesetzten BaP-Konzentration bewirkt 0,1 µM Galangin jeweils eine deutliche und signifikante Hemmung der induzierten EROD- in Caco-2-Zellen (für alle Proben: $p < 0,001$). Die am höchsten durch BaP gesteigerten Aktivitäten bei BaP-Konzentrationen von 3 µM und 5 µM werden durch Galangin um 23 % bzw. 40 % gehemmt (Abbildung 99).

6.6.2 Hemmung der lebermikrosomalen CYP1A1-abhängigen EROD-Aktivität durch Flavonoide

Um den Einfluss von Flavonoiden auf die CYP1A1-Aktivität detaillierter und präziser untersuchen zu können, haben wir Lebermikrosomen 3-Methylcholanthren-behandelter Ratten als gut definierte CYP1A1-Quelle verwendet (Roos & Mahnke, 1996; Roos, 2002). Das 3-Methylcholanthren ist ein effizienter Induktor von CYP1A1 und führt bei Ratten nach Applikation zu einem enormen Anstieg der lebermikrosomalen CYP1A1-Aktivität. Für die Bestimmung der CYP1A1-Aktivität wurde wieder Ethoxyresorufin als Substrat verwendet (EROD-Aktivität).

Entsprechende Enzymkinetiken wurden über 15 min in Gegenwart verschiedener Flavonoidkonzentrationen im Bereich zwischen 0.5 nM und 157 μ M aufgenommen, wie hier am Beispiel von Galangin gezeigt (Abbildung 100).

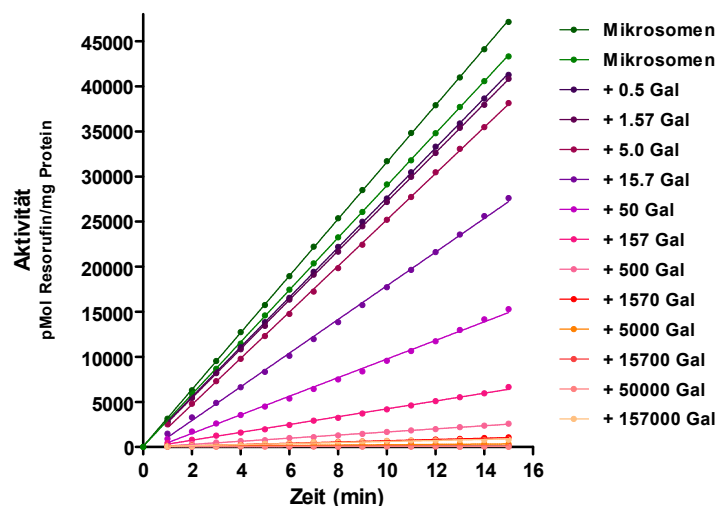


Abbildung 100: Kinetiken der Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität von Lebermikrosomen in Gegenwart von Galangin in verschiedenen Konzentrationen. Die Mikrosomen stammen aus Ratten, die mit 3-Methylcholanthren behandelt wurden. Galangin-Konzentrationen: 0,5 nM bis 157000 nM. Ethoxyresorufin-Konzentration: 2,3 μ M. Messzeitraum: 0 - 15min. Temperatur: 30°C.

Trägt man die Steigungen aus Abbildung 100, die den Enzymaktivitäten in pMol Resorufin \cdot mg Protein⁻¹ \cdot min⁻¹ entsprechen, prozentual als Hemmung gegen die Galangin-Konzentration auf, so ergibt sich die in Abbildung 101 dargestellte Hemmkurve, wobei die ungehemmte Aktivität 100% gesetzt wird entsprechend einer Hemmung von 0%. Durch eine Kurvenanpassung über nicht-lineare Regression unter der Annahme einer Bindungsstelle wurde für Galangin ein I₅₀-Wert von 24,9 nM ermittelt, was dieses Flavonoid als sehr potenten Inhibitor der CYP1A1-Aktivität identifiziert.

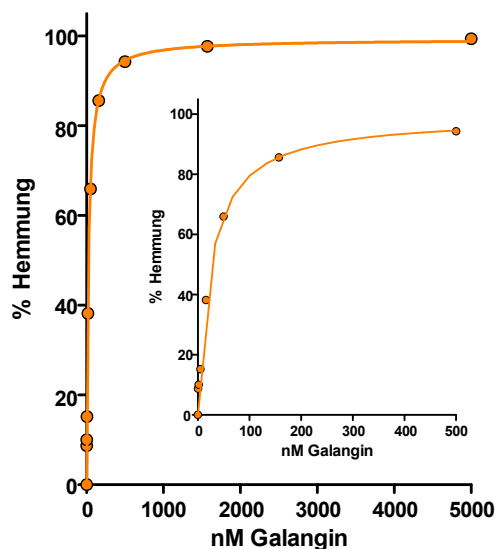


Abbildung 101: Hemmung der lebermikrosomalen Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität durch Galangin. Auftragung in % Hemmung der Kontroll-Aktivität. Durch nicht-lineare Regression wurde eine Kurvenanpassung unter der Annahme einer Bindungsstelle vorgenommen. Hieraus konnte ein I_{50} -Wert von 24,9 nM bestimmt werden.

Eingeschachtelte Grafik: Zur besseren Sichtbarkeit der Effekte im Bereich niedriger Konzentrationen ist nur der Konzentrationsbereich bis 500 nM Galangin dargestellt.

Entsprechende Versuche wurden auch für die anderen hier verwendeten Flavonoide durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Form von Balkendiagrammen dargestellt, um auch die Effekte bei den eingesetzten niedrigen Konzentrationen deutlich werden zu lassen. In Abbildung 102 sind die Ergebnisse von Kaempferol und Quercetin gegenübergestellt. Während für Kaempferol eine typische Hemmkurve erzielt wird ($IC_{50} = 19,9$ nM), zeigen sich für Quercetin Besonderheiten im Verlauf. Neben der Hemmung wird im Konzentrationsbereich zwischen und 50 und 500 nM ein stimulierender Effekt auf die Aktivität deutlich. Durch die Überlagerung der Effekte lässt sich ein typischer IC_{50} -Wert für die Hemmung durch Quercetin schlecht errechnen, ist aber mit Vorbehalt in Tabelle 5 angegeben. Myricetin wirkt ebenfalls stimulierend auf die Aktivität und zeigt sich bei höheren Konzentrationen als vergleichsweise schlechter Inhibitor (Abbildung 102 & Tabelle 5).

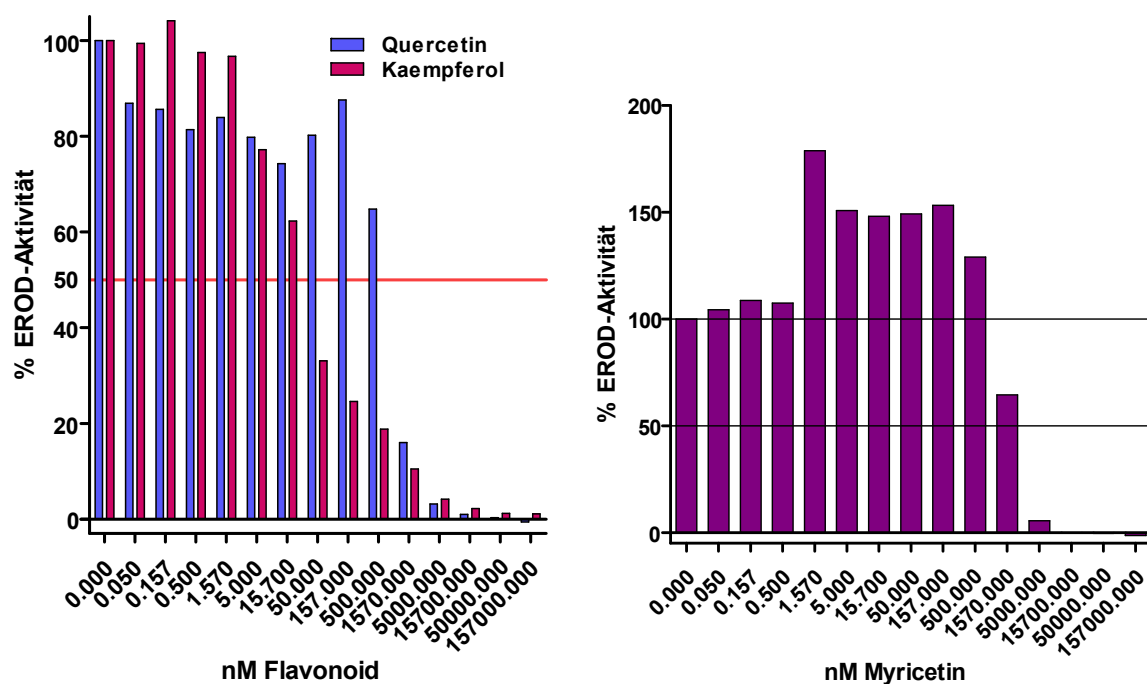


Abbildung 102: Hemmung der lebermikrosomalen Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität durch Quercetin, Kaempferol und Myricetin. Auftragung in % der Aktivität gegenüber der ungehemmten Kontrolle.

Die beobachteten Phänomene waren Anlass, weitere Flavonoide mit leicht strukturellen Unterschieden, in die Untersuchungen einzubeziehen. Chrysin ist dem Galangin strukturell ähnlich und unterscheidet sich nur durch das Fehlen des 3-Hydroxyls im C-Ring. Seine Hemmwirkung auf die EROD-Aktivität entspricht in etwa der des Galangins (Abbildung 103 & Tabelle 5). Ein Derivat des Kaempferols, das 2,3-Dihydrokaempferol oder Aromadedrin, erhält man durch Reduktion der Doppelbindung im C-Ring. Das Hemmpotenzial von Dihydrokaempferol ist mit einem $IC_{50} > 5 \mu M$ gegenüber Kaempferol (IC_{50} von ca. 20 nM) drastisch erniedrigt. Die Methylierung der 3-Hydroxylgruppe im Quercetin zeigt keine bedeutsame Auswirkung auf die Hemmeigenschaften des Quercetins bezüglich der EROD-Aktivität (vergleiche Abbildung 103, links vs. Abbildung 102, rechts)

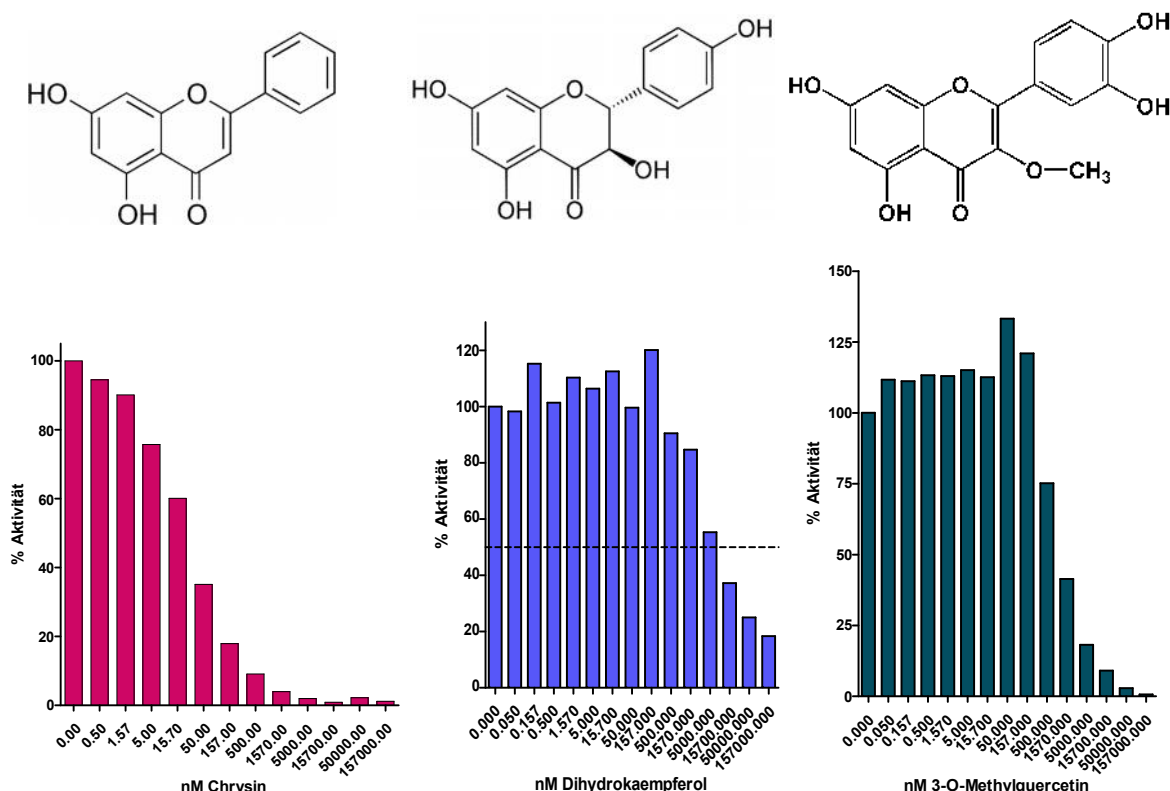


Abbildung 103: Hemmung der lebermikrosomalen Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität durch Chrysin, Aromadedrin und 3-O-Methylquercetin. Auftragung in % Hemmung der Kontroll-Aktivität.

Flavonoid	IC ₅₀	Tabelle 5: IC ₅₀ -Werte für die Hemmung der mikrosomalen EROD-Aktivität durch Flavonoide. Die IC ₅₀ -Werte wurden durch nicht-lineare Regression aus den Hemmkurven berechnet.
Galangin	24,9 nM	
Kaempferol	19,9 nM	
Quercetin	837 nM	
Myricetin	> 2 µM	
Chrysin	17,9 nM	
Aromadedrin	> 5 µM	

6.6.3 Flavonoide als Radikalfänger

Die Radikalfängereigenschaften der eingesetzten Flavonoide haben wir vergleichend durch Reaktion mit dem stabilen Radikal 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) untersucht und dabei das Vitamin E-ähnliche Trolox als Positivkontrolle verwendet. Die Strukturen der beiden Substanzen sind in Abbildung 104 gezeigt. Im Gegensatz zur üblichen in der Literatur verwendeten Methode, die nur eine Endpunktbestimmung des DPPH-Verbrauchs nach 30 min Reaktionsdauer vorsieht, haben wir Kinetiken über 30 min mit 1-minütigen Meßabständen für mindestens 6 verschiedene

Flavonoid-Konzentrationen aufgenommen. Hierdurch werden Aussagen zur Reaktionsgeschwindigkeit und zur Stöchiometrie der Reaktion ermöglicht (Molyneux P 2004).

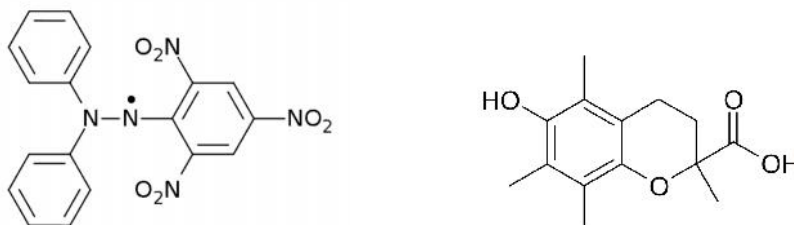


Abbildung 104: Struktur von DPPH (links) und vom Radikalfänger Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)
Trolox wurde als Positivkontrolle verwendet.

Das Absorptionsspektrum des DPPH-Radikals weist bei 517 nm ein Maximum auf (Abbildung 105), das wir für die Messungen genutzt haben. Im Spektrum zeigt sich ein isosbestischer Punkt bei 428 nm sowie ein weiteres Maximum bei ca. 320 nm. Der als Positivkontrolle eingesetzte Radikalfänger Trolox reduziert DPPH sehr effizient, so dass nach 30min-Reaktionszeit bereits bei einer Konzentration von 31,4 μM kein DPPH-Radikal mehr detektierbar ist, gezeigt durch das komplette Verschwinden des 517 nm-Peaks. Unter identischen Versuchsbedingungen erweist sich Quercetin noch effizienter als Trolox, Galangin jedoch als schlechter Radikalfänger. Bei einer Konzentration von 10 μM reduziert Quercetin das DPPH (35 μM) komplett, während hierfür Galangin-Konzentrationen > 100 μM notwendig sind (Abbildung 105).

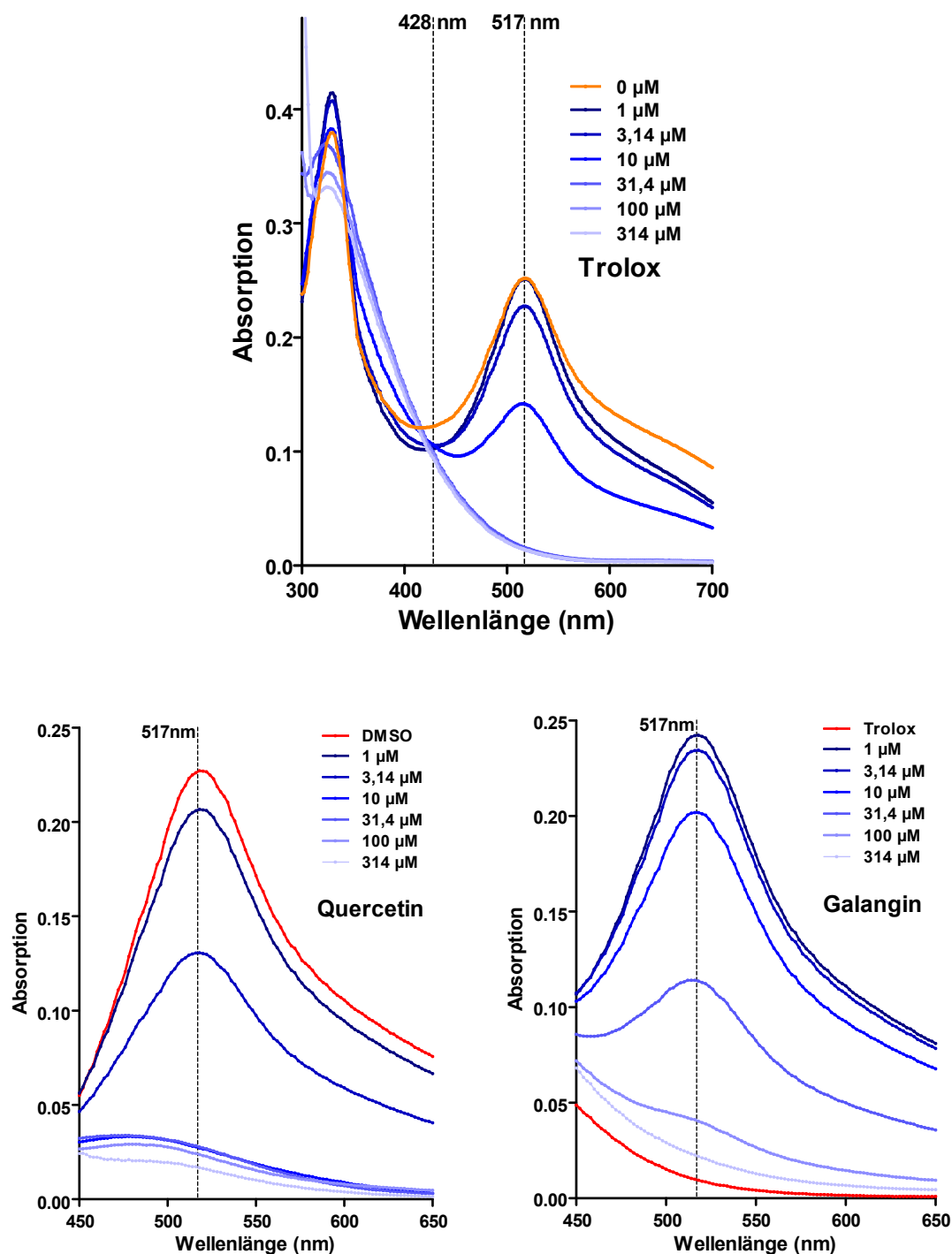


Abbildung 105: DPPH-Spektren

DPPH-Spektren im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 700 nm bzw. 450 nm bis 650 nm aufgenommen nach Inkubation von DPPH mit verschiedenen Konzentrationen des Radikalfängers Trolox und der beiden Flavonoide Galangin (a) und Quercetin (b). DPPH-Konzentration: 35 µM. Inkubationsdauer: jeweils 30 min. Das Absorptionsmaximum bei 517 nm ist gekennzeichnet.

Von den hauptsächlich in dieser Arbeit untersuchten Flavonoiden Galangin, Kaempferol, Quercetin und Myricetin wurden DPPH-Reduktionskinetiken bei verschiedenen Konzentrationen im Bereich zwischen 1 und 314 µM aufgenommen.

Zum Vergleich wurde in jedem Versuch Trolox als Positivkontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 106 zusammengefasst. Hinsichtlich des 30 min-Endpunkts lässt sich folgende Reihung der Flavonoide bezüglich ihrer Radikalfänger-Effizienz vornehmen:

Quercetin, Myricetin (10 μ M) > Kaempferol (31,4 μ M) > Galangin (314 μ M)

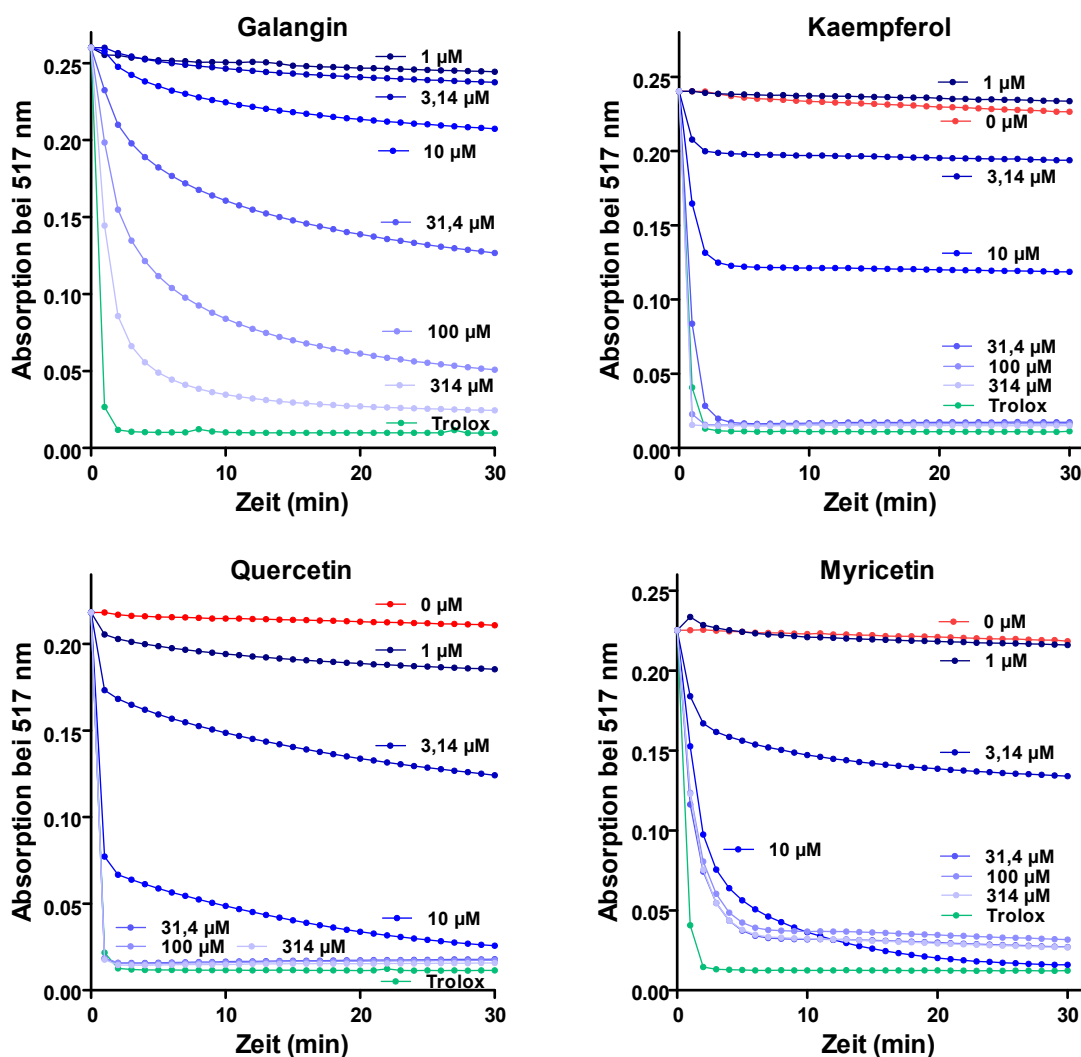


Abbildung 106: Kinetiken der DPPH-Reduktion durch verschiedene Flavonoide: (a) Galangin, (b) Kaempferol, (c) Quercetin und (d) Myricetin. Messzeitraum: 0 – 30 min. Messwellenlänge: 517 nm. DPPH-Konzentration: 47 μ M.

Die Reduktionskinetiken von Quercetin und Myricetin lassen deutlich 2 Phasen mit unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeit erkennen. Insbesondere sieht man beim Quercetin eine ultraschnelle Anfangsphase, die offenbar in weniger als 1 Minute abgeschlossen ist sowie eine darauffolgende relativ langsame Reaktion. In der schnellen Phase werden durch 10 μ M Quercetin ca. 20 μ M DPPH (2/3 des

eingesetzten DPPH) reduziert, entsprechend einer Stöchiometrie von 1 : 2 und damit einer Übertragung von 2 Wasserstoffatomen ($\bullet\text{H}$) pro Quercetinmolekül. In der langsamen Phase wird offenbar ein drittes H-Radikal vom Quercetin auf DPPH übertragen. Auch Kaempferol reagiert schnell mit DPPH ist aber aufgrund der Stöchiometrie der Reaktion weniger effizient als Quercetin, da es maximal nur halb so viele DPPH-Radikale reduzieren kann wie Quercetin. Myricetin ist von seiner Kapazität mit dem Quercetin vergleichbar zeigt aber eine langsamere Initialreaktion. Die Reaktion mit Galangin ist langsam und auch bezüglich der Stöchiometrie ineffizient. Erst ein ca. 10-facher Überschuss von Galangin gegenüber DPPH kann dieses vollständig reduzieren, was auf eine reversible Reaktion hinweist.

Wie bei den Versuchen zur EROD-Hemmung haben wir auch hier die drei strukturell leicht abweichend Flavonoide Chrysin, 2,3-Dihydrokaempferol und 3-O-Methylquercetin hinsichtlich ihrer Radikalfängereigenschaften untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 107 zusammengefasst. Das fehlende 3-Hydroxyl im Chrysin bewirkt gegenüber Galangin einen nahezu kompletten Verlust des Radikalfänger-Potenzials. Das gilt gleichermaßen auch für das Dihydrokaempferol bei Verlust der 2,3-Doppelbindung gegenüber Kaempferol. Auch die Methylierung des 3-Hydroxyls im Quercetin macht sich deutlich bemerkbar, führt aber nicht zu einem Verlust des Radikalfänger-Potenzials. Nach einer schnellen aber weniger effizienten Anfangsphase im Vergleich zu Quercetin, folgt mit 3-O-Methylquercetin eine lange langsame Phase, wobei beide Flavonoide nach 30-minütiger Reaktionsdauer eine ähnlich hohe Reduktionskapazität aufweisen.

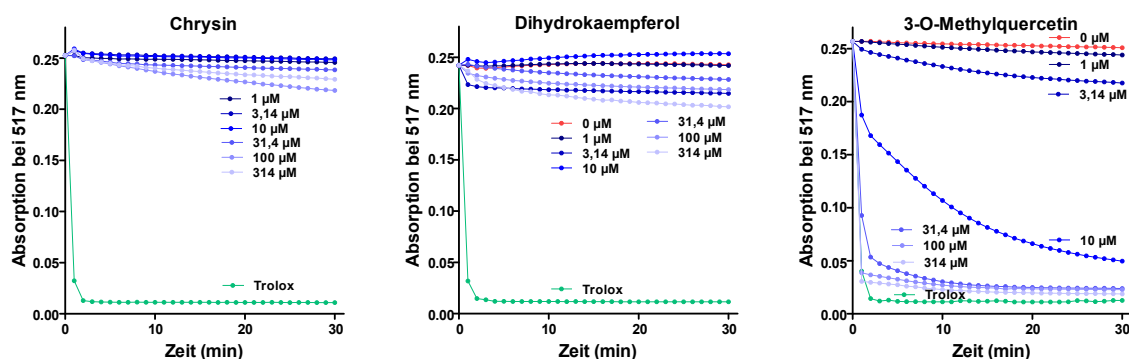


Abbildung 107: Kinetiken der DPPH-Reduktion durch verschiedene Flavonoide: (a) Chrysin, (b) Dihydrokaempferol und (c) 3-O-Methylquercetin. Messzeitraum: 0 – 30 min. Messwellenlänge: 517 nm. DPPH-Konzentration: 47 μM .

7 DISKUSSION

Die Wirkung von Benzo[a]pyren auf die Ausbildung von DNA-Schäden durch die Bildung von DNA-Addukten wurde bereits in der Literatur in verschiedenen Zelltypen beschrieben (Melendez-Colon et al. 1999, Binkova et al. 2000, Solhaug et al. 2004, Tekpli et al. 2010, Phillips & Venitt 2012, Hodek et al. 2013). DNA-Schäden können mittels der Phosphorylierung des Histon H2AX (γ -H2Ax) oder einem Comet-Assay detektiert werden. Mit dem Comet-Assay zeigt sich nach 24 h Exposition mit 10 μ M und 3 μ M BaP eine deutliche Ausbildung von DNA-Strangbrüchen in Caco-2-Zellen. Bei einer Konzentration von 3 μ M BaP kann eine Strangbruch-Steigerung von 300 % gegenüber der Lösemittelkontrolle erreicht werden.

In einer aktuellen Studie von 2013 konnte eine zeitabhängige Induktion des γ -H2Ax durch BaP-Exposition von PUBEC-Zellen (pig urinary epithelial cells) festgestellt werden. Bereits nach einer Stunde wurde eine signifikante Steigerung der γ -H2Ax Foci und das Maximum der Induktion nach 24 h erreicht (Verma et al. 2013).

Hruba et al. konnten keine BaP-induzierte Aktivierung von γ -H2Ax oder von Chk2 in LNCaP (humane prostate carcinoma cells) feststellen (Hruba et al. 2010).

In humanen Amnion FL Zellen, Hela Zellen und in ATM^{-/-} Mausfibroblasten kann BaP γ -H2Ax induzieren (Zhou et al. 2006, Yan et al. 2011). Zur Überprüfung, ob BaP γ -H2Ax direkt induziert oder ob die vorgeschalteten Kinasen beeinflusst werden, wurden verschiedene Kinase-Inhibitoren verwendet. Die PI3K wurde durch Koffein und Wortmannin inhibiert und nur bei Hela Zellen konnte die Phosphorylierung von H2Ax verhindert werden (Yan et al. 2011).

In Caco-2-Zellen konnte ich bereits 6 h nach BaP-Exposition einen Anstieg der γ -H2Ax-Foci und eine weitere Steigerung nach 24 h feststellen (Abbildung 15). Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen der Studie von Verma et. al 2013 mit PUBEC-Zellen. Die BaP-vermittelte Induktion der γ -H2Ax foci scheint in verschiedenen Zelllinien zu erfolgen, jedoch ist diese Induktion Zeitabhängig. Sowohl in meiner Dissertation, als auch in der Literatur, wird eine Steigerung der γ -H2Ax foci mit einer ansteigenden BaP-Expositionsdauer nachgewiesen.

Auch für Flavonoide werden in der Literatur Einflüsse auf die H2Ax-Phosphorylierung berichtet. In Li et al. 2009 wird gezeigt, dass Kaempferol in einer Kolon-Krebszelllinie (HCT116) die Phosphorylierung von H2Ax induziert (Li et al. 2009). Eigene Versuche konnten diese Wirkung von Kaempferol in Caco-2-Zellen nicht bestätigen, jedoch

sind die eingesetzten Konzentrationen nicht vergleichbar. Die bei Li et al. wirksame Konzentration ist 6-fach höher als die von mir eingesetzte Konzentration.

Die Vermutung der Konzentrationsabhängigkeit der Flavonoid-Wirkung wird durch eine aktuelle Studie von Sun et al. 2013 bestätigt (Sun et al. 2013). Hier wurde die Wirkung von Quercetin auf die Ausbildung von DNA-Schäden in einer humanen Fibrosarkoma Zelllinie mit Wildtyp p53 (HT1080) mittels H2Ax-Phosphorylierung nachgewiesen. Die Expositionsdauer von 24 h ist identisch zu der in meinen Versuchen, die Quercetin-Konzentration mit 30 – 80 μM allerdings bis zu 8-fach höher als von mir eingesetzt (10 μM). Bei den in der Studie von Sun et al. eingesetzten Quercetin-Konzentrationen sinkt jedoch auch die Zellviabilität auf 75 % bei 30 μM bzw. 50 % bei 80 μM . In meinen Versuchen habe ich eine Flavonoidkonzentration bei 80 % Zellviabilität gewählt (10 μM), welche auch natürlich, durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln im Dickdarm entstehen kann.

In einer weiteren Studie von Ye et al. 2004 wurde ebenfalls für Quercetin eine Induktion der H2Ax-Phosphorylierung in ATM und ATM-Null humanen Lymphoblastoiden Zellen nachgewiesen. Jedoch ist auch hier die eingesetzte Konzentration an Quercetin 10 000 fach höher (100 mM), als die von mir eingesetzte Konzentration (10 μM). Es konnte ermittelt werden, dass die Quercetin-vermittelte Induktion der H2Ax-Phosphorylierung über die Aktivierung des ATM erfolgt (Ye et al. 2004).

Beim Nachweis der H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen konnte ich ebenfalls eine leichte Induktion dieser durch Quercetin sowie Myricetin feststellen. Das vierte eingesetzte Flavonoid Galangin zeigt keinen Effekt auf die H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen.

Bereits bei Sun et al. wurden die verschiedenen Effekte von Curcumin und Quercetin auf die H2Ax-Phosphorylierung diskutiert. Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass die strukturell ähnlichen Flavonoide Que, Myr, Gal und Kae doch sehr unterschiedliche Effekte auf die H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2 Zellen haben. Myricetin und Quercetin mit 3 bzw. 2 OH-Gruppen am B-Ring besitzen eine stärkere Wirkung auf die H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen als Kaempferol mit nur einer OH-Gruppe oder Galangin, welches keine OH-Gruppe am B-Ring besitzt.

Die Wirkung von BaP und auch von Flavonoiden auf die Ausbildung von DNA-Schäden konnte mittels Comet-Assay und der H2Ax-Phosphorylierung gezeigt werden. Es stellt sich nun die Frage, ob die Flavonoide einen direkten Effekt auf die

BaP-medierte Einflüsse besitzen und ob diese den Einzeleffekten der Flavonoide entsprechen. Zur Flavonoid-Wirkung auf die BaP-induzierten Effekte gibt es bisher nur wenige Daten in der Literatur. Niestroy et al. zeigen einen hemmenden Einfluss der Flavonoide Quercetin und Kaempferol auf BaP-medierte Effekte auf den AhR-Signalweg in Caco-2-Zellen (Niestroy et al. 2011). Zudem konnte in einer Studie von Izawa et al. 2007 gezeigt werden, dass eine Aktivierung des AhR über Dieselabgas-Partikel durch Quercetin und Ginkgo biloba-Extrakt inhibiert werden kann (Izawa et al. 2007).

In meiner Dissertation wurden die Flavonoide Galangin, Kaempferol, Quercetin und Myricetin auf deren Wirkung auf BaP-medierte Ausbildung von DNA-Schäden in Caco-2-Zellen getestet.

Alle Flavonoide, mit Ausnahme von Kaempferol, verhindern die Entstehung BaP-mediierter DNA-Strangbrüche. Dies konnte im Comet-Assay gezeigt werden. Bei der Überprüfung der H2Ax-Phosphorylierung konnte trotz des Einzeleffektes von Quercetin eine Reduzierung der BaP-induzierten H2Ax-Phosphorylierung sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch im Western-Blot nachgewiesen werden. Auch die anderen Flavonoide Gal, Kae und Myr haben einen reduzierenden Effekt auf die BaP-vermittelte Induktion der H2Ax-Phosphorylierung. Jedoch ist der Effekt von Kaempferol und Myricetin deutlich geringer als der von Galangin und Quercetin.

Die strukturellen Unterschiede der Flavonoide treten hier in einer ganz anderen Anordnung auf. Trotz der stärkeren Einzeleffekte von Myricetin und Quercetin besitzt Quercetin einen sehr starken Effekt auf die Reduktion der BaP-medierte H2Ax-Phosphorylierung. Nicht überraschend ist der stark reduzierende Effekt des Galangins auf die BaP-induzierte H2Ax-Phosphorylierung, welches alleine keine Wirkung auf die H2Ax-Phosphorylierung zeigte. Die Anzahl der OH-Gruppen am B-Ring scheint zwar in den Einzelreaktionen der Flavonoide auf die H2Ax-Phosphorylierung eine Rolle zu spielen, nicht aber bei den Effekten auf die BaP-vermittelte H2Ax-Phosphorylierung.

BaP entfaltet viele seiner Wirkungen über die Bindung und damit die Aktivierung des Arylhydrokarbon-Rezeptors (AhR), einem ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor (Nebert et al. 2000). Über diesen Mechanismus wird gleichsam auch die Metabolisierung von BaP in Gang gesetzt, indem die entsprechenden schon genannten P450-Enzyme CYP1A1 und CYP1B1 induziert werden. Des Weiteren wird über die Aktivierung des AhR-Signalweges mittels BaP auch die Ausbildung von DNA-

Addukten über die Aktivierung des CYP1A1 induziert (Shimada 2006, Hodek et al. 2013).

Neben TCDD und PAK hat der AhR auch natürlich vorkommende Liganden, darunter auch sekundäre Pflanzenstoffe wie bestimmte Flavonoide (Ciolino et al. 1999, Zhang et al. 2003). In der Studie von Ciolino et al. wurden die Flavonoide Quercetin und Kaempferol bezüglich der Interaktion mit dem AhR genauer untersucht. Es zeigte sich, dass Quercetin zeit- und konzentrationsabhängig in der Lage ist die Expression der CYP1A1-mRNA sowie die CYP1A1-Enzymaktivität in MCF-7 Zellen zu steigern. Diese Steigerung konnte durch den Einsatz des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D verhindert werden. In AhR-defizienten Mäusen, war Quercetin nicht in der Lage die CYP1A1-Aktivität zu steigern. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Effekte des Quercetins über den AhR mediiert werden (Ciolino et al. 1999). Kaempferol hingegen zeigte keinen direkten Effekt auf die CYP1A1-Expression, jedoch ist es in der Lage, die TCDD induzierte CYP1A1 Transkription zu inhibieren (Ciolino et al. 1999).

In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass AhR-agononistische und antagonistische Effekte von Flavonoiden, unter anderem auch von Galangin, Quercetin, Myricetin und Kaempferol, zelltypspezifisch sind (Zhang et al. 2003).

Um zu überprüfen, ob die gezeigten Effekte auf die H2Ax-Phosphorylierung durch BaP oder Flavonoide über den AhR-Signalweg gesteuert werden, wurde der AhR-Antagonist 3'-Methoxy-4'-Nitroflavon (MNF) (Davis, Jr. et al. 2003) zur Ausschaltung des AhR,-Signalwegs sowie neben BaP das Flavonoid Quercetin als AhR-Agonist verwendet.

Durch Immunfluoreszenz-Markierung konnte festgestellt werden, dass der AhR-Inhibitor MNF selbst keinen Effekt auf die H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen besitzt, aber die BaP-vermittelte Induktion der H2Ax-Phosphorylierung unterbindet. Somit ist der Effekt des Inhibitors vergleichbar mit dem des Quercetins, welches ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die BaP-mediierte γ H2Ax Induktion besitzt. Diese Ergebnisse werden durch den Nachweis im Western-Blot bestätigt. Die BaP-mediierte Induktion des γ H2Ax kann durch den Einsatz von MNF um 98 % in Caco-2-Zellen reduziert werden. Auch die inhibierende Wirkung des Quercetins wird durch den Einsatz von MNF noch deutlich verstärkt. Folglich ist die durch BaP ausgelöste H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2 Zellen vom AhR-Signalweg abhängig.

Die von mir nachgewiesene AhR-Abhängigkeit der BaP-medierte H2Ax-Phosphorylierung geht mit den Daten der Literatur konform (Nebert et al. 2000, Shimada 2006, Hodek et al. 2013) und bestätigen die Bindung und Aktivierung des AhR über Flavonoide (Ciolino et al. 1999, Zhang et al. 2003, Niestroy et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BaP die Phosphorylierung von H2Ax in Caco-2-Zellen induziert und diese Induktion über den AhR-Signalweg vermittelt wird. Die Flavonoide haben zum Teil einen Effekt auf die Induktion der H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2 Zellen, wie Quercetin und Myricetin. Durch Quercetin konnte bewiesen werden, dass die Effekte der Flavonoide sich in Anwesenheit von BaP gegenüber ihren Einzeleffekten unterscheiden können. Im Fall von Quercetin wirkt dieses in Anwesenheit von BaP als Inhibitor des AhR Signalweges.

Es stellt sich dabei die Frage, wie und wo das Quercetin bzw. Flavonoide generell den AhR-Signalweg beeinflussen, um den BaP-Effekt zu verändern. Und ob dieses Phänomen auch in anderen BaP-medierte Prozessen wie zum Beispiel bei der Apoptose zu finden ist.

Die Fähigkeit von BaP, Apoptose auszulösen, ist schon seit langem bekannt. Bereits 1998 konnte in einer Studie von Salas et al. die Induktion der Apoptose in humanen B-Lymphoblasten mittels einer TUNEL-Analyse (Terminal desoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) detektiert werden. Nach einer 18 h-Exposition mit 10 μ M BaP zeigte sich ein Anstieg der Apoptose um 75 % (Salas & Burchiel 1998). Ein solcher Effekt wurde von Zhao et al. 2011 auch in neuronalen Ratten-Zellen mittels TUNEL-Analyse gefunden. So konnte nach BaP-Exposition ein Anstieg apoptotischer Bläschen auf der Oberfläche von Neuronen des zerebralen Cortex und Hippocampus nachgewiesen werden (Zhao et al. 2011).

In den hier untersuchten Caco-2-Zellen konnte ich mittels FACS-Analyse ebenfalls eine durch BaP-induzierte Apoptose zu detektieren. Dabei konnte ich bei einer Exposition mit BaP für 24 h eine 400-fache Steigerung der Apoptose gegenüber der Lösemittelkontrolle (DMSO) erzielen. Im Gegensatz zur Studie von Salas et al. waren bereits 3 μ M BaP ausreichend, um eine signifikante Steigerung der Apoptose in Caco-2-Zellen zu erzielen. Dieser Unterschied in der Empfindlichkeit könnte auf die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien zurückzuführen sein.

Alle von mir getesteten Flavonoide zeigen in der FACS-Analyse keine oder gegebenenfalls eine nur marginale Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen. Auch in der Literatur ist generell keine Flavonoid-induzierte Apoptose bekannt. Jedoch wird in

der Literatur, sowohl für BaP, als auch für die Flavonoide Quercetin und Kaempferol ein Effekt auf die Apoptose über die Apoptosemarker Bax und Bcl-2 und der Caspasen-3, -7 und -9 beschrieben (Salas & Burchiel 1998, Ko et al. 2004, Li et al. 2009, Chien et al. 2009, Zhao et al. 2011, Luo et al. 2011, Jiang et al. 2013). Für Myricetin und Galangin gibt es auch hierzu keine Daten in der Literatur.

Nach meinen Ergebnissen wird der mRNA-Level verschiedener Apoptosemarker weder durch BaP noch durch die getesteten Flavonoide beeinflusst. Aber sowohl BaP als auch Flavonoide können die Expression des pro-apoptotischen Bax-Proteins in Caco-2-Zellen gegenüber der Kontrolle steigern. Die BaP-medierte Steigerung konnte bereits 1998 in humanen B-Zellen nachgewiesen werden (Salas & Burchiel 1998). Auch in neuronalen Ratten Zellen konnte eine BaP-induzierte Steigerung des Bax-Proteins gezeigt werden, diese geht mit dem Absinken der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 einher (Zhao et al. 2011, Jiang et al. 2013). Letzteren Effekt konnte ich in Caco-2-Zellen nicht finden. Bei den Flavonoiden zeigt lediglich Quercetin einen hemmenden Effekt auf den basalen Bcl-2-Proteinlevel. Myricetin und Kaempferol habe ich in diesem Zusammenhang nicht getestet.

In der Literatur sind lediglich Effekte von Kaempferol und Quercetin auf die Bax- und Bcl2-Proteininduktion bekannt (Luo et al. 2011, Chien et al. 2009). In einer Studie von Luo et al. 2011 wird eine BaP-ähnliche Reaktion durch Kaempferol in ovariellen Krebszellen gezeigt. Kaempferol steigert die Bax-Expression und senkt die Bcl-2-Expression. Eine Steigerung der Bax-Expression konnte, wie bereits beschrieben, für alle in meiner Thesis verwendeten Flavonoiden nachgewiesen werden. Das Absenken der Bcl-2-Expression wurde für Kaempferol nicht getestet. Der Effekt von Quercetin auf die Bax- und Bcl-2-Proteininduktion ist in einer Studie von Chien et al. 2009 beschrieben. Diese unterstützt die von mir generierten Ergebnisse, da in der Studie von Chien et al. in humanen Brustkrebszellen die Proteinexpression des pro-apoptotischen Bax durch Quercetin gesteigert und die des anti-apoptotischen Bcl-2 gesenkt wird (Chien et al. 2009).

Die Apoptose-relevanten Proteine Bax und Bcl-2 werden in Caco-2-Zellen durch BaP und Flavonoide unterschiedlich beeinflusst. Es stellt sich nun die Frage, ob auch die Aktivität der Apoptose-regulierenden Caspase-3 mittels BaP oder Flavonoiden verändert wird. Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität der Caspase-3 in Caco-2-Zellen durch BaP ca. 100 fach gegenüber der Kontrolle gesteigert ist. Ko et al. 2004 fanden in Maus-Hepatoma-Zellen ebenfalls eine BaP-vermittelte Induktion

der Apoptose über den intrinsischen Caspase-Weg (Caspase-3 und -9) (Ko et al. 2004).

In einer neuen Studie von Jiang et al. 2013 wurden verschiedene Zelllinien verwendet, um die Auswirkung von BaP auf die p53-unabhängige Induktion der Nekroptose zu untersuchen. Dabei konnte eine Aktivierung der Caspase-3 auf Proteinebene gezeigt werden (Jiang et al. 2013). Dies unterstützt die in meiner Dissertation generierten Ergebnisse. Denn auch in den Caco-2-Zellen sind die Auswirkungen von BaP und Flavonoiden unabhängig vom p53-Signalweg, da in diesen Zellen per se kein p53 vorhanden ist.

Zur Untersuchung des Flavonoid-Einflusses auf die Aktivität der Caspase-3 habe ich exemplarisch die beiden Flavonole Quercetin und Galangin verwendet. Sowohl Galangin als auch Quercetin zeigen in Caco-2-Zellen keinen Effekt auf die Caspase-3-Aktivität. Dies steht im Gegensatz zu der in humanen Brustkrebszellen gefundenen Quercetin-vermittelten Induktion der Caspase-3 (Chien et al. 2009). Die abweichenden Ergebnisse meiner Thesis zur Literatur können auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. Als erstes wurden in der Studie von Chien et al. 25-fach höhere Konzentrationen an Quercetin verwendet als in meinen Versuchen.

Des Weiteren ist die von mir verwendete Caco-2-Zelllinie im Gegensatz zu den von Chien et al. verwendeten Brustkrebszellen p53-defizient. Außerdem unterscheiden sich die Brustkrebszellen zu den von mir verwendeten Kolonkarzinomzellen vermutlich erheblich in der Signaltransduktion des Quercetin (Mense et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Effekte von Quercetin und Kaempferol auf die Apoptose in Caco-2-Zellen bis auf die Induktion der Caspase-3-Aktivität durch Quercetin den BaP-Effekten entsprechen. Zwar ist generell kein Anstieg der Apoptose durch die Flavonoide detektierbar (FACS-Analyse), aber die Proteininduktion des pro-apoptotischen Bax-Proteins wird wie durch BaP-Exposition gesteigert, während die des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 gesenkt wird.

Da sich in Bezug auf die Ausbildung von DNA-Schäden in Caco-2-Zellen eine Diskrepanz im Verhalten der Flavonoide allein oder in Kombination mit BaP zeigte, stellt sich nun die Frage, ob auch für die Induktion der Apoptose ein solches Wirkungsmuster der Flavonoide zu erkennen ist. Zur Überprüfung, ob es einen generellen Effekt der Flavonoide auf die BaP-medierte Apoptose gibt, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Danach unterdrücken alle eingesetzten Flavonoide die durch BaP 4-fach gegenüber der Kontrolle erhöhte Apoptose signifikant um bis zu 95

% (BaP + Kaempferol) in Caco-2-Zellen. Zuvor konnte gezeigt werden, dass die Apoptosemarker Bax und Bcl-2 auf Proteinebene sowohl durch BaP als auch durch Flavonoide erhöht werden (Bax) oder nicht beeinflusst bzw. vermindert werden (Bcl-2). Das pro-apoptotische Protein Bax wird durch BaP in Caco-2-Zellen induziert und dieser BaP-Effekt kann durch alle eingesetzten Flavonoide um maximal 33 % reduziert werden. Dieser Effekt steht im Gegensatz zu den Einzeleffekten der Flavonoide, welche generell eine mit BaP-vergleichbare Induktion des Bax-Proteinlevels in Caco-2-Zellen hervorrufen.

Auch in Bezug auf das anti-apoptotische Protein Bcl-2 ergeben sich Diskrepanzen im Flavonoidverhalten durch eine gleichzeitige BaP-Exposition. BaP hat zunächst keinen Effekt auf den Bcl-2-Proteinlevel und auch das Flavonoid Galangin zeigt alleine keine Veränderung, bewirkt aber in Kombination mit BaP eine Verminderung um 58 % gegenüber der Kontrolle. Quercetin hingegen hat bereits alleine einen reduzierenden Effekt auf den Bcl-2-Proteinspiegel. In Kombination mit BaP wird dieser Effekt aber wieder vollständig aufgehoben.

Die Aktivität der Caspase-3 ist ein weiterer bekannter Apoptosemarker (Wieder et al. 2001, Ko et al. 2004). Wie bereits beschrieben, steigert BaP die Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen zweifach. Die Flavonoidwirkung auf die BaP-medierte Steigerung der Caspase-3 Aktivität wurde exemplarisch für Quercetin und Galangin getestet. Obwohl beide Flavonoide alleine keinen Effekt auf die Caspase-3-Aktivität besitzen, senken sie die BaP-vermittelte Steigerung um 60 % (Quercetin) und marginal um 30 % (Galangin).

So zeigen Flavonoide auch auf die BaP-induzierte Apoptose einen entgegenwirkenden Effekt, wie ich es bereits schon bezüglich der Ausbildung von DNA-Schäden nachweisen konnte. Des Weiteren konnte ich beweisen, dass die BaP-induzierten DNA-Schäden über den AhR-Signalweg generiert werden. Es soll nun geklärt werden, ob auch die BaP-vermittelten Auswirkungen auf die Apoptose AhR-abhängig sind. Zusätzlich sollen die Wirkungen der Flavonoide auf die Apoptose in Caco-2-Zellen generell und in Kombination mit BaP auf ihre AhR-Abhängigkeit getestet werden.

Die Initiation der Apoptose über die TCDD-vermittelte Aktivierung des AhR wird in der Literatur kontrovers beschrieben (Marlowe & Puga 2005), in manchen Studien wird Apoptose initiiert und in manchen unterbunden. Es konnte in einer Studie gezeigt werden, dass TCDD in der Lage ist, durch die Inhibition der Apoptose eine

klonale Expansion hervorzurufen (Bock & Kohle 2005). Diese unterschiedlichen Ergebnisse zum Einfluss des Liganden-aktivierten AhR auf die Apoptose führen zu verschiedenen Vermutungen. Es wurde vermutet, dass durch die AhR-medierte Induktion des CYP1A1 oxidativer Stress entsteht, der letztendlich für die Initiierung der Apoptosekaskade maßgeblich beteiligt sein könnte (Nebert et al. 2000).

Diese These wird durch eine Studie unterstützt, in der Maus-Hepatoma-Zellen (HepG2) mit BaP exponiert wurden. Durch diese Exposition entstand eine BaP-vermittelte Apoptose, die sowohl mit der Aktivierung des AhR und der Induktion von CYP1A1 in Zusammenhang gebracht werden konnte. Durch die Aktivierung der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenase CYP1A1 wird die Entstehung des ultimativen Kanzerogens Benzo[a]pyren-diol-Epoxid (BPDE) initiiert.

Mittels der BaP-Metaboliten, BaP-7,8-dihydrodiol und Benzo[a]pyren-diol-Epoxid BPDE-2 konnte gezeigt werden, dass deren Effekt auf die Bcl-2 Familie mit der Ausschüttung von mitochondrialem Cytochrom c und der Caspase-Aktivierung korrelieren (Chen et al. 2003).

Es steht jedoch außer Frage, dass der AhR einen entscheidenden Einfluss auf die Apoptose besitzt. Es wird vermutet, dass der AhR das Tumorwachstum durch Inhibierung der Apoptose steigert. Zusätzlich wird die Umwandlung zu einem invasiven, metastatischen Phenotyp unterstützt und gefördert (Schleizinger et al. 2006). Der Einfluss des AhR auf die Apoptose wurde von Davis et al. in MCF-7 Zellen gezeigt. Es wurde eine konzentrationsabhängige Steigerung der Apoptose durch TCDD erzielt und durch die Inhibierung des AhR über MNF konnten diese Effekte rückgängig gemacht werden (Davis, Jr. et al. 2003).

MNF wurde auch in dieser Arbeit eingesetzt, um die Rolle des Ah-Rezeptors hinsichtlich BaP- und Flavonoid-abhängiger Effekte auf die Apoptose zu klären. In der Literatur wird zwar, wie zuvor beschrieben, eine Aktivierung des AhR-Signalweges über Flavonoide bestätigt, aber ob dieser Einfluss der Flavonoide auf den AhR mit der entgegenwirkenden Eigenschaft der Flavonoide auf die BaP-induzierte Apoptose zusammenhängt, ist bislang nicht bekannt.

Wie zuvor bereits mittels FACS-Analyse gezeigt, induziert BaP die Apoptose in Caco-2-Zellen um das vierfache gegenüber der Kontrolle. MNF alleine hat keinen Effekt auf die Apoptose in Caco-2-Zellen. Jedoch kann MNF die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen signifikant ($p = 0,005$) um 85 % senken oder gänzlich aufheben. Diese Feststellung geht mit den Ergebnissen der Studien von Davis et al.

und Schlezinger et al. konform und bestärkt meine Vermutung, dass die BaP-medierte Apoptose AhR-abhängig ist. Dies konnte auch schon bei der Ausbildung von DNA-Schäden in Caco-2-Zellen gezeigt werden.

Der Einfluss des AhR auf die Apoptose scheint jedoch ligandenabhängig zu sein, da die Inhibierung des AhR mittels MNF ohne Liganden keinerlei Effekt auf die Apoptose in Caco-2-Zellen aufweist. Die getesteten Flavonoide, Galangin, Quercetin, Myricetin und Kaempferol, haben alleine keinen oder lediglich einen marginalen Effekt auf die Apoptose in Caco-2-Zellen jedoch steigern sowohl Galangin als auch Quercetin bei gleichzeitiger AhR-Inhibierung die Apoptose 1,7-fach bzw. 2-fach gegenüber der Kontrolle. Dieser Effekt war zunächst nicht zu erwarten, da auch die Flavonoide den AhR-Signalweg aktivieren und somit auch vermutet wurde, dass die Effekte wie bei BaP AhR-abhängig sind. Eine Steigerung der Apoptose-Induktion in Caco-2-Zellen, trotz AhR-Inhibierung lässt vermuten, dass die Flavonoide zum Teil auch unabhängig vom AhR in Caco-2-Zellen agieren.

Inwiefern nun die Flavonoid-Wirkung auf die BaP-medierte Apoptose AhR-abhängig ist, wurde in einem Kombinationsexperiment nachgewiesen. Die Flavonoide senken die BaP-medierte Apoptose generell ab. Durch die Inhibierung des AhR mittels MNF bei gleichzeitiger Exposition mit BaP und Flavonoid, wird die BaP-vermittelte Apoptose zwar nahezu vollständig aufgehoben (maximal 98 % MBG), als durch die Flavonoide in Kombination mit BaP und aktivem AhR, aber dieser Effekt ist jedoch nur auf die Wirkung des MNF zurückzuführen. Durch diesen Versuch lässt sich nicht eindeutig festlegen, ob die inhibierende Flavonoidwirkung auf die BaP-vermittelte Apoptose in Caco-2-Zellen AhR-abhängig ist, oder nicht. Zusätzlich zeigt aber sich hier wieder der Effekt, dass Flavonoide allein anders reagieren als in Kombination mit BaP.

Die Auswirkungen von BaP und Quercetin auf die Induktion von Bax wurden ebenfalls auf AhR-Abhängigkeit untersucht. BaP induziert die Proteinexpression von Bax um das 5,7-fache in Caco-2-Zellen. Weder MNF allein noch MNF in Kombination mit Quercetin zeigen einen inhibierenden Effekt auf die BaP-vermittelte Induktion des Bax-Proteins. Demnach ist die Induktion des Bax-Proteins durch BaP in Caco-2-Zellen nicht AhR-abhängig.

Als letztes wurde zur Überprüfung der AhR-Abhängigkeit der BaP- und Flavonoideffekte auf die Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen der Einfluss auf die Caspase-3-Aktivität untersucht. Wie zuvor in der Literatur beschrieben, steigern

sowohl BaP, als auch die Flavonoide die Caspase-3-Aktivität in diversen Zelllinien (Ko et al. 2004, Chien et al. 2009, Li et al. 2009, Jiang et al. 2013). Der AhR-Inhibitor MNF und das Flavonoid Quercetin verändern die Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen nicht, während BaP eine Steigerung der Caspase-3-Aktivität um das 2-fache (218 %) verursacht. Eine Inhibierung des AhR mit MNF bei gleichzeitiger Exposition mit BaP führt zu einer Aufhebung bis auf Kontrollniveau der BaP-induzierten Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen. Quercetin supprimiert generell den BaP-vermittelten Effekt auf die Caspase-3-Aktivität (um 60 %) und durch eine gleichzeitige AhR-Inhibierung wird die BaP-induzierte Caspase-3-Aktivitätssteigerung bis auf das Kontrollniveau gesenkt.

Somit lässt sich sagen, dass die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen AhR-abhängig ist. Auch die Flavonoide zeigen wieder ihre inhibierenden Eigenschaften auf BaP-medierte Effekte. Die Effekte der Flavonoide scheinen teilweise AhR-abhängig, aber auch unabhängig zu sein. Dies könnte eine Erklärung für ihr zum Teil sehr unterschiedliches Verhalten allein oder in Kombination mit BaP sein.

Ergebnisse der vorliegenden Dissertation und Literaturdaten zeigen, dass viele BaP- und Flavonoid-medierte Effekte über den AhR-Signalweg initiiert werden. Es ist aber auch bekannt, dass der AhR mit anderen Signalwegen korrespondiert wie zum Beispiel mit den MAP-Kinasen JNK, ERK und p38, die auch Einfluss auf den Zellzyklus und die Initiation der Apoptose haben (Garnett & Marais 2004, Seger & Krebs 1995, Pearson et al. 2001, Weston & Davis 2007).

In meiner Thesis werden die mRNA-Spiegel der drei MAPK zwar durch BaP und teils durch Flavonoide beeinflusst, aber dies spiegelt sich nicht auf Proteinebene wieder. Weder BaP noch die BaP-Flavonoid-Kombinationen zeigen Effekte auf den Protein-Level oder den Phosphorylierungsgrad der JNK.

Widersprüchlich zu meinen Ergebnissen konnten Tan et al. zeigen, dass TCDD, ein AhR-Agonist, **sowohl ERK als auch JNK** aktiviert. Jedoch konnte nicht gezeigt werden, dass auch ein Einfluss auf die nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren wie ELK (Erk1/2) und c-jun (JNK) besteht (Tan et al. 2004, Tan et al. 2002). In Makrophagen konnte der Einfluss des TCDD auf die JNK nicht bestätigt werden, obwohl die Caspase-3-Aktivität gesteigert wurde. In Fibroblasten (mouse embryonic fibroblasts) und in CV-1 (african green monkey kidney) Zellen konnte JNK jedoch durch TCDD aktiviert werden (Tan et al. 2002).

Das unterschiedliche Aktivierungsverhalten der JNK durch TCDD oder BaP wird nicht an der Substanz selbst liegen, da BaP als Analogon zu TCDD verwendet wird und die Aktivierung des AhR über beide Substanzen in gleichem Maße erfolgen kann (Bock 1993, Lee & Shim 2007). Vielmehr könnte der Unterschied in der Zelllinie, da auch bei Tan et al. verschiedene Zelllinien verwendet wurden (siehe oben) und auch hier konnte nicht immer eine Aktivierung der JNK erzielt werden.

In meinen Ergebnissen wird der Protein-Spiegel von ERK weder durch BaP-Exposition noch durch die BaP-Flavonoid-Kombinationen beeinflusst. Jedoch kann BaP die Phosphorylierung der ERK in Caco-2-Zellen zweifach induzieren. Dieser Induktionseffekt wird durch alle eingesetzten Flavonoide, nämlich Galangin, Kaempferol, Quercetin und Myricetin komplett aufgehoben.

Wie bereits beschrieben konnte auch Tan et. al eine Aktivierung der ERK-MAPK durch TCDD nachweisen (Tan et al. 2004).

In meiner Thesis bewirken BaP und die Flavonoide alleine keine Induktion des p38-Protein-Spiegels in Caco-2-Zellen. Jedoch zeigen die Flavonoide in Kombination mit BaP einen hemmenden Effekt auf den basalen p38-Protein-Spiegel in Caco-2-Zellen um maximal 30 %. Auf die Phosphorylierung der p38 MAPK zeigen Flavonoide in Kombination mit BaP sehr unterschiedliche Effekte. Galangin und Quercetin steigern die BaP-vermittelte-p38-Phosphorylierung deutlich 122 % bzw. 350 % während Myricetin diesen komplett aufhebt und darüber hinaus den Basal-Spiegel um 30 % senkt und Kaempferol den Induktions-Effekt von BaP um 36 % aufhebt

Die Phosphorylierung der MAPK-p38 durch BaP wird in einer Studie von Weiss et al. bestätigt (Weiss et al. 2005).

Die teilweise entgegenwirkenden oder auch triggernden Effekte auf die BaP-medierte Phosphorylierung der MAPK wurden bisher in der Literatur nach meinem Wissen nicht überprüft.

Die Effekte auf den ERK- und p38-Protein-Spiegel sowie dessen Phosphorylierung scheinen AhR-abhängig zu sein. Jedoch bewirkt eine Koexposition von BaP und Quercetin bei gleichzeitiger AhR-Inhibition eine deutlich gesteigerte p38-Phosphorylierung. Diese Erkenntnis der AhR-abhängigkeit kann in der Literatur mit Ausnahme der JNK bestätigt werden. Der in Tan et al. beschriebene Effekt der JNK-Aktivierung über den AhR (Tan et al. 2002, Tan et al. 2004) kann durch meine Ergebnisse nicht bestätigt werden. Jedoch werden auch in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse beschrieben, bei der gleichen Studie von Tan et al,

konnte in einer anderen Zelllinie keine Beeinflussung der JNK über den AhR nachgewiesen werden (Tan et al. 2002). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der durch JNK aktivierbare Transkriptionsfaktor c-jun auch unabhängig von JNK über eine AhR-abhängige Aktivierung der MAPK p38 erfolgt. Dabei wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung der p38 über die Aktivierung des AhR durch TCDD erfolgt. Der genaue Mechanismus, wie die Phosphorylierung des p38 erfolgt, ist noch nicht geklärt, da bisher keine p38-phosphorylierenden Kinasen bekannt sind, die vom AhR aktiviert werden (Weiss et al. 2005). Ein weiteres Zusammenspiel des AhR mit der MAPK p38 wurde von Ikuta et al. beschrieben. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Akkumulation des AhR im Nukleus über p38 gesteuert werden kann. Sie ist mit einer p38-abhängigen Phosphorylierung am Ser68 des NES (nuclear-export-signal) des AhR assoziiert (Ikuta et al. 2004).

Es scheint, als würde besonders die JNK eine andere Rolle spielen, als die beiden anderen MAPK p38 und ERK. Die JNK liefert in der Literatur selbst viele widersprüchliche Ergebnisse, die sich teilweise mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation decken oder widersprechen. Grundsätzlich scheint dieses Phänomen vor allem Zell-basiert zu sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierung der MAPK durch den AhR generell offenbar Liganden- und Zelltyp-spezifisch ist (Reiners, Jr. et al. 1998, Park et al. 2005).

Da, wie hier gezeigt, Flavonoide verschiedene Effekte auf die Ausbildung BaP-induzierter DNA-Schäden und der Apoptose in Caco-2-Zellen haben, sollen jetzt die zugrundeliegenden Mechanismen näher beleuchtet werden. Von besonderer Relevanz erscheinen Xenobiotika-Wechselwirkungen der Substanzen mit dem Enzym CYP1A1, die man als analog zu Pharmaka-Wechselwirkungen betrachten kann. Das CYP1A1 ist vielen in Tumoren überexprimiert und metabolisiert Prokarzinogene z.B. BaP zu Epoxid-Intermediaten, welche anschließend über Epoxid-Hydrolasen zu Dihydrodiolen und über einen weiteren CYP-abhängigen Schritt zu Dihydrodiol-Epoxiden, den ultimalen DNA-reaktiven Karzinogenen, aktiviert werden (Murray et al. 1995, Murray et al. 1995, Murray et al. 1997, Shimada & Fujii-Kuriyama 2004, Androutsopoulos et al. 2010). Flavonoiden wird nachgesagt, dass sie die Ausbildung von Tumoren über eine Anzahl, im Einzelnen nicht immer klar definierten, biologischen Mechanismen inhibieren können. Unter anderem sind dies Effekte auf die Prokarzinogen-aktivierenden Enzyme der Cytochrom P450 CYP1-Familie (Androutsopoulos et al. 2010).

Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die Flavonoideffekte auf die Ausbildung von DNA-Schäden, Apoptose und auch verschiedener Signalwege AhR-abhängig sind.

In meinen Experimenten zur Detektion der Effekte auf den AhR-Signalweg wurde der mRNA-Level der Komponenten AhR, AhRR und AIP des AhR-Signalweges weder durch BaP noch durch die Flavonoide beeinflusst, lediglich Myricetin hat auf das mRNA-Niveau der Komponenten AhR und AhRR einen signifikant inhibierenden Effekt um 70 % bzw. 85 % ($p < 0,001$). Der ARNT-mRNA-Level wird signifikant durch BaP um 40 % ($p = 0,007$), durch Myricetin um 60 % ($p = 0,004$) und durch Quercetin um 30 % ($p = 0,023$) gegenüber der Kontrolle abgesenkt.

Niestroy et al. zeigten, dass BaP den AhR-mRNA-Level signifikant erhöht, während der AhRR- und ARNT-mRNA-Level durch BaP supprimiert werden. Quercetin supprimiert ebenfalls den ARNT-mRNA-Level, steigert aber den AhRR-mRNA-Level. Kaempferol zeigt keinerlei Effekt auf die Expression der hier untersuchten AhR-Signalwegskomponenten (Niestroy et al. 2011).

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation stehen zum Teil im Gegensatz zu den von Niestroy et al. erzielten Ergebnissen. Es sind zwar sowohl Konzentration als auch Zelllinie zu meinen Experimenten identisch, aber bei Niestroy et al. wurde die doppelte Inkubationszeit (48 h) sowohl für die Zellen an sich als auch für die Exposition mit BaP und Flavonoiden verwendet. Zu den Flavonoiden Myricetin und Galangin wurden in der Literatur auch keine Daten hinsichtlich von Effekten auf die AhR-Signalwegskomponenten gefunden.

Myricetin verhält sich im Bezug auf den AhR-Signalweg anders als die anderen getesteten Flavonoide. So reguliert Myricetin, gemessen am AhR-mRNA-Spiegel, offenbar die AhR-Transkription herunter und bewirkt dadurch letztendlich eine Erniedrigung des AhR-Protein-Spiegels. Letzterer wird durch Myricetin um ca. 40 % abgesenkt, während er durch BaP, Quercetin und Kaempferol um 110 %, 50 % und 90 % angehoben wird. Auf den AhRR-Protein-Spiegel hat BaP einen marginal induzierenden Effekt, während Galangin, Kaempferol und Myricetin einen inhibierenden Effekt besitzen. Die inhibierende Wirkung des Myricetins auf AhR und AhRR manifestiert sich sowohl auf dem mRNA-Level und dem Proteinlevel.

Die mRNA-Spiegel von AhR, AhRR, ARNT und AIP werden in Caco-2-Zellen durch BaP nicht beeinflusst und auch die Flavonoide zeigen in Kombination mit BaP keinerlei Effekte.

Jedoch konnte eine signifikante Steigerung des CYP1A1-mRNA-Levels durch BaP und das Flavonoid Quercetin festgestellt werden und zwar um den Faktor 166 ($p < 0,001$) bzw. den Faktor 30 ($p < 0,001$). Auch für Galangin und Myricetin konnte eine Steigerung des CYP1A1-mRNA-Levels in Caco-2-Zellen nachgewiesen werden, die jedoch geringer als die durch Quercetin hervorgerufene war. Kaempferol hat keinen Einfluss auf den CYP1A1-mRNA Level in Caco-2-Zellen. Die starke Induktion der CYP1A1-mRNA durch BaP (Faktor 166) wird durch die Flavonoide, mit Ausnahme durch Myricetin, zu einem großen Anteil gemindert, und zwar zwischen 27 % und 40 %. Das blockierende Verhalten von Galangin, Kaempferol und Quercetin auf die BaP-vermittelte CYP1A1-mRNA-Induktion steht hier wieder im vermeintlichen Widerspruch zu ihrem eigenen CYP1A1-Induktionsvermögen und ist abermals eine Bestätigung weiterer Beobachtungen zum divergierenden Verhalten der Flavonoide als Einzelsubstanz und in Kombination mit BaP.

In Niestroy et al. wurde bereits die Induktion von CYP1A1-mRNA durch BaP und Quercetin in Caco-2-Zellen beschrieben (Niestroy et al., 2011). In einer Studie von Vrba et al. zeigte das Flavonoid Quercetin in HepG2-Zellen ebenfalls eine signifikante Aktivierung des AhR und steigerte die Transkription von CYP1A1 nach 24 h (Vrba et al. 2012). Für Kaempferol konnte auch in der Studie von Niestroy et al. kein Effekt nachgewiesen werden (Niestroy et al. 2011). Der Effekt von Galangin und Myricetin auf die CYP1A1-Induktion wird hier meines Wissens zum ersten Mal beschrieben.

Wie zu erwarten zeigt BaP einen starken Einfluss auf den AhR-Signalweg, aber auch die Flavonoide zeigen eine deutliche Interaktion auf den AhR-Signalweg. Verwirrend scheint jedoch ihr unterschiedliches Verhalten allein oder in Kombination mit BaP. Folgende Überlegungen bieten eine Erklärung für dieses Phänomen. BaP und Flavonoide aktivieren den AhR als Transkriptionsfaktor und konkurrieren als Liganden um dieselbe Bindungsstelle am Rezeptor. Bei angenommen nicht sehr stark divergierenden Affinitäten von BaP und Flavonoiden zum Rezeptor sollten sich parallel BaP-AhR- und auch Flavonoid-AhR-Komplexe in relevantem Ausmaß bilden können und dann jeweils zur Transkription entsprechender Gene, wie CYP1A1, führen. Die Hypothese ist nun, dass die gebildeten Liganden-Rezeptor-Komplexe eine unterschiedliche Effizienz als Transkriptionsfaktoren aufweisen. Somit würde die Transkriptionsrate für CYP1A1 vom Verhältnis der verschiedenen Liganden-Rezeptorkomplexe abhängen mit einem Maximum bei reiner BaP-Exposition, einem

Minimum bei reiner Flavonoid-Exposition und dazwischenliegenden Werten bei kombinierten-Expositionen.

Auf Protein-level können nur BaP und Quercetin eine signifikante Steigerung des CYP1A1-Proteinlevels hervorrufen, BaP ca. um den Faktor 4000 und Quercetin um 2000. Alle eingesetzten Flavonoide können die BaP-medierte CYP1A1-Induktion um bis zu 58 % (BaP-Myricetin) in Caco-2-Zellen reduzieren. Das Ah-Rezeptor-Repressor-Protein (AhRR) wird in Caco-2-Zellen marginal durch BaP induziert. Die Flavonoide Galangin und Quercetin verhindern den BaP-Effekt und unterdrücken darüber hinaus die Basalexpression, wohingegen Myricetin und Kaempferol keine Effekte zeigen. Das auf mRNA-Ebene festgestellte abweichende Verhalten der Flavonoide allein und in Kombination mit BaP wird auch auf Proteinebene für Galangin und Quercetin deutlich. Der inhibierende Effekt, den Myricetin alleine zeigt, kann auch auf Proteinebene in Kombination nicht nachgewiesen werden.

Letztendlich lässt sich sagen, dass auch hier die Flavonoide in der Lage sind BaP-medierten Effekten auf den AhR-Signalweg entgegenzuwirken. Von besonderer Relevanz für die biochemischen Prozesse ist, dass diese Effekte vor allem auf der Proteinebene inklusive der Enzymaktivität deutlich sind.

Alle hier in Caco-2-Zellen nachgewiesenen Induktionseffekte durch BaP oder Flavonoide werden durch Inhibierung des AhR nahezu vollständig aufgehoben, nämlich um bis zu 98 % durch BaP und 88 % durch Quercetin. Dementsprechend ist die Induktion der CYP1A1-Proteinexpression sowohl durch BaP als auch durch Flavonoide AhR-abhängig. Diese starke Wirkung des AhR-Inhibitors MNF unterstützt meine zuvor angestellte These über die Ausbildung unterschiedlicher Rezeptor-Ligand-Komplexe und deren unterschiedliche Effizienz als Transkriptionsfaktoren. MNF ist ebenfalls ein Ligand des AhR und bildet einen entsprechenden Komplex aus. Dieser scheint die höchste DNA-Bindungsaffinität zu besitzen und wirkt somit als stärkster Transkriptionsfaktor, der aber nicht zu einer Induktion der Zielgene des AhR führt. Bei der kompetitiven Situation von BaP und MNF wird also der MNF-AhR-Komplex dem BaP-AhR-Komplex überlegen sein und somit eine BaP-medierte CYP1A1-Induktion nahezu vollständig verhindern.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen, werden durch BaP in Caco-2-Zellen nicht nur CYP1A1-mRNA und CYP1A1-Protein erhöht sondern auch die entsprechende enzymatische Aktivität, die mit Hilfe des spezifischen Substrats 7-Ethoxyresorufin bestimmt wurde. Neben BaP sind auch alle Flavonoide in der Lage,

die EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen über eine Erhöhung des Enzym-Spiegels zu steigern. BaP steigert die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 µM gegenüber der Kontrolle signifikant ($p < 0,001$). Mit noch höheren BaP-Konzentrationen sinkt dann jedoch die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen wieder. Bei Galangin ist ein ähnliches Phänomen zu sehen, die niedrigste Konzentration an Galangin von 1 µM steigert die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen am meisten. Mit den Flavonoiden Quercetin und Myricetin findet ebenfalls eine hohe Steigerung der CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen statt. Anders als bei BaP und Galangin ist hier eine Aktivitätssteigerung mit steigender Flavonoidkonzentration zu finden. Das Flavonoid Kaempferol bietet bezüglich der CYP1A1-Aktivitätssteigerung ein anderes Bild als die restlichen Flavonoide. Ohne eine vorherige Induktion durch BaP oder andere CYP1A1-Induktoren zeigen die Flavonoide eine deutliche Steigerung der CYP1A1-Aktivität.

Neben der indirekten Wirkung auf die CYP1A1-Aktivität über eine AhR-abhängige Induktion des Enzyms, interagieren Flavonoide auch direkt mit CYP1A1 und anderen CYP-Enzymen, indem sie als Substrat, Inhibitor oder Aktivator fungieren (Silva et al. 1997, Androutsopoulos et al. 2010, Vrba et al. 2012, Androutsopoulos & Tsatsakis 2013). Auch diese Aussage wird durch meine Ergebnisse bestätigt und steht im Einklang mit der aufgestellten Rezeptor-Ligand-Komplex Hypothese, solange die gesteigerte oder verminderte Aktivität des CYP1A1 über die Transkription gesteuert wird.

Eine mögliche Erklärung, wie Flavonoide direkt die Aktivität von CYP1A1 beeinflussen können wird in einer Studie von Silva et al gezeigt, Kaempferol ist ein potenter CYP1A1-Inhibitor, wird aber bei dieser Inhibition zu Quercetin umgewandelt wird (Silva et al. 1997). Es könnte also sein, dass die Flavonoide mit BaP auch kompetitiv mit BaP um das CYP1A1 „kämpfen“ und dadurch die durch BaP-erzeugte CYP1A1-Aktivität in Kombination mit Flavonoiden abnimmt.

Eine andere Möglichkeit ist wie bereits erwähnt die Regulation der CYP1A1-Aktivität über die Transkription und somit über den AhR.

In der Literatur findet man hierzu nur ein vage ähnliches Experiment. In *D. melanogaster* wurde über Benzol, Toluol und Xylol die CYP1A1-Aktivität erhöht und durch einen AhR-Inhibitor 3',4'-Dimethoxyflavon signifikant abgesenkt (Singh et al. 2011). Anscheinend wird also die Steigerung der CYP1A1-Aktivität sowohl durch monozyklische als auch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe über den

AhR-Signalweg reguliert. In einer Studie von Takemura et al. wurde Chrysoeriol, ein 3'-methoxyflavon, in Kombination mit BaP auf dessen AhR- und CYP1A1-Einfluss in MCF-7-Zellen untersucht. So konnte die deutlich Steigerung der AhR-Aktivität durch BaP durch Chrysoeriol konzentrationsabhängig vermindert werden. Auch der inhibitorische Effekt von Chrysoeriol auf die BaP-vermittelte CYP1A1-Aktivierung sei AhR-abhängig (Takemura et al. 2010).

Die AhR-Abhängigkeit der inhibierenden Flavonoideffekte konnten in dieser Dissertation auch gezeigt, aber nicht eindeutig nachgewiesen werden, da der MNF Effekt im Vordergrund stand.

Der Einfluss auf die Enzymaktivität des CYP1A1, direkt oder über die Transkriptionsebene ist besonders entscheidend für die Ausbildung reaktiver Metabolite. Eine Inhibierung von CYPs würde die Kapazität der Zelle zur Ausbildung reaktiver Metabolite vermindern. Auch in Bezug auf oxidativen Stress und die Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies gehen die Fähigkeiten von Flavonoiden über ihren Einfluss auf die Expression relevanter Phase II-Enzyme, wie GST, hinaus, indem sie als Radikalfänger direkt mit den ROS reagieren können, die unter anderem auch durch die Aktivität von CYP-Enzymen entstehen.

Der Inhibitionseffekt von Galangin wurde durch eine BaP-Konzentrationsreihe von 1-40 μM die zur CYP1A1-Aktivitäts-Induktion verwendet wurde und einer Zugabe von 0,1 μM Galangin zu jeder BaP-Konzentration nachgewiesen. BaP kann die CYP1A1-Aktivität konzentrationsabhängig bis zu 5-fach bei einer Konzentration von 3 μM zu steigern. Bei höheren BaP-Konzentrationen nimmt die Induktionswirkung wieder ab. Unabhängig von der eingesetzten BaP-Konzentration bewirkt 0,1 μM Galangin jeweils eine deutliche und signifikante Hemmung der induzierten EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen (für alle Proben: $p < 0,001$). Die höchste BaP-induzierte CYP1A1-Aktivitätssteigerung bei 3 μM BaP wird um 23 % durch Galangin gesenkt. Die größte Hemmwirkung des Galangin (40 %) auf den BaP-Effekt zeigt sich bei einer BaP-Konzentration von 5 μM .

Die Hemmung der EROD-Aktivität durch die vier in dieser Arbeit näher untersuchten Flavonoide sowie zusätzlich von Chrysin wurde in den Caco-2-Zellen getestet. Der ausgeprägte, hemmende Effekt von Chrysin auf CYP1A1 wurde schon in der Literatur beschrieben (Siess et al. 1990, Kim et al. 2005). Während Myricetin und Kaempferol keine oder allenfalls eine nur schwache Hemmwirkung besitzen, ist sie für Galangin, Quercetin und insbesondere für Chrysin deutlich.

Die Fähigkeit von Flavonoiden die CYP1-Enzymaktivität zu inhibieren und damit die Entstehung kanzerogener Metabolite zu verhindern wurde bereits in mehreren Studien bewiesen (Ciolino et al. 1999, Wen & Walle 2005). Es ist schon lange bekannt, dass Flavonoide die EROD-Aktivität in humanen- und Ratten-Lebermikrosomen inhibieren können (Siess et al. 1995, Zhai et al. 1998), wobei die Struktur der Flavonoide einen maßgeblichen Einfluss auf das CYP1-Hemmpotenzial besitzt. Insbesondere sollen die C2-C3-Doppelbindung und die Anzahl der Hydroxyl-Substituenten am A-Ring eine entscheidende Rolle spielen. Di- und tri-hydroxylierte Flavonoide, wie Chrysin und Galangin gelten als potente CYP1A2 Inhibitoren (Zhai et al. 1998). Beide genannten Flavonoide besitzen im B-Ring keine Hydroxylgruppen, wohl aber jeweils zwei im A-Ring und Galangin zusätzlich eine in 3-Position des C-Rings. Auch Quercetin mit insgesamt 5 Hydroxylgruppen wird in der Literatur als ein potenter CYP1A1 und 1B1 Inhibitor in Enzym- und Zell-basierten Tests beschrieben (Schwarz & Roots 2003, Schwarz et al. 2005, Chaudhary & Willett 2006, Leung et al. 2007). In einer Studie von Chaudhary et al. konnte in TCDD-exponierten Prostata-Krebszellen die 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase Aktivität mittels Quercetin in einem Konzentrationsbereich von 0,5 – 5 µM inhibiert werden (Chaudhary & Willett 2006). Myricetin und Kaempferol sollen eine ähnlich gute EROD-Inhibitionskapazität wie Quercetin besitzen (Chaudhary & Willett 2006). Galangin wurde in von Ciolino et al. als ein effektiver CYP1A1-Inhibitor in *in vitro* und Zell-basierten Testsystemen beschrieben (Ciolino et al. 1999).

Um den Einfluss von Flavonoiden auf die CYP1A1-Aktivität detaillierter und präziser untersuchen zu können, haben wir Lebermikrosomen 3-Methylcholanthren-behandelter Ratten als gut definierte CYP1A1-Quelle verwendet (Roos & Mahnke, 1996; Roos, 2002). Das 3-Methylcholanthren ist ein effizienter Induktor von CYP1A1 und führt bei Ratten nach Applikation zu einem enormen Anstieg der lebermikrosomalen CYP1A1-Aktivität.

Während für Kaempferol eine typische Hemmkurve erzielt wird ($IC_{50} = 19,9 \text{ nM}$), zeigen sich für Quercetin Besonderheiten im Verlauf. Neben der Hemmung wird im Konzentrationsbereich zwischen 50 und 500 nM ein stimulierender Effekt auf die Aktivität deutlich. Chrysin ist dem Galangin strukturell ähnlich und unterscheidet sich nur durch das Fehlen des 3-Hydroxyls im C-Ring. Seine Hemmwirkung auf die EROD-Aktivität entspricht in etwa der des Galangins. Ein Derivat des Kaempferols, das 2,3-Dihydrokaempferol oder Aromadedrin, erhält man formal durch Reduktion

der Doppelbindung im C-Ring. Das Hemmpotenzial von Dihydrokaempferol ist mit einem $IC_{50} > 5 \mu M$ gegenüber Kaempferol (IC_{50} von ca. 20 nM) drastisch erniedrigt. Die Methylierung der 3-Hydroxylgruppe im Quercetin zeigt keine bedeutsame Auswirkung auf die Hemmeigenschaften des Quercetins bezüglich der EROD-Aktivität.

Aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das CYP1A1-Inhibitionspotential der Flavonoide mit steigender Anzahl der Hydroxylgruppen am B-Ring abnimmt. Galangin und Chrysin, die am B-Ring kein Hydroxyl besitzen, sind potente Inhibitoren der EROD-Aktivität. Wir haben in diesem Zusammenhang noch weitere Flavonoide sowie andere Pflanzeninhaltsstoffe auf ihre Hemmwirkung untersucht. Die hierbei erzielten Ergebnisse sind nicht Bestandteil dieser Arbeit und werden separat veröffentlicht.

Die Radikalfängereigenschaften der eingesetzten Flavonoide haben wir vergleichend durch Reaktion mit dem stabilen Radikal 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) untersucht und dabei das Vitamin E-ähnliche Trolox als Positivkontrolle verwendet. Im Gegensatz zur üblichen in der Literatur verwendeten Methode, die nur eine Endpunktbestimmung des DPPH-Verbrauchs nach 30 min Reaktionsdauer vorsieht, haben wir Kinetiken über 30 min mit 1-minütigen Meßabständen für mindestens 6 verschiedene Flavonoid-Konzentrationen aufgenommen. Hierdurch werden Aussagen zur Reaktionsgeschwindigkeit und zur Stöchiometrie der Reaktion ermöglicht (Molyneux P 2004).

Der als Positivkontrolle eingesetzte Radikalfänger Trolox reduziert DPPH sehr effizient, so dass nach 30min-Reaktionszeit bereits bei einer Konzentration von $31,4 \mu M$ kein DPPH-Radikal mehr detektierbar ist, gezeigt durch das komplette Verschwinden des 517 nm-Peaks. Unter identischen Versuchsbedingungen erweist sich Quercetin noch effizienter als Trolox, der potente CYP1A1-Inhibitor Galangin jedoch als schlechter Radikalfänger. Bei einer Konzentration von $10 \mu M$ reduziert Quercetin das DPPH ($35 \mu M$) komplett, während hierfür Galangin-Konzentrationen $> 100 \mu M$ notwendig sind.

Von den hauptsächlich in dieser Arbeit untersuchten Flavonoiden Galangin, Kaempferol, Quercetin und Myricetin lässt sich folgende Reihung der Flavonoide bezüglich ihrer Radikalfänger-Effizienz vornehmen:

Quercetin, Myricetin ($10 \mu M$) $>$ Kaempferol ($31,4 \mu M$) $>$ Galangin ($314 \mu M$)

Flavonoide wirken also der Ausbildung BaP-induzierter reaktiver Metabolite auf zweierlei Weise entgegen, zunächst durch Herabsetzen der CYP1A1-Induktion und dann durch effiziente Inhibierung der dann noch vorhandenen Enzymaktivität. Schließlich haben sich die hier untersuchten Flavonoide als effiziente Radikalfänger erwiesen. Die Effizienz der Flavonoide als AhR-Agonist, CYP1A1-Inhibitor oder Radikalfänger hängt in unterschiedlicher Weise von der Anzahl der Hydroxylgruppen in ihrem B-Ring ab. So nimmt die Inhibitorwirkung mit steigender Anzahl der Hydroxylgruppen ab, das Radikalfängerpotenzial aber zu.

8 LITERATUR

- Alessi DR, Cohen P. 1998. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8(1):55-62
- Androutsopoulos VP, Papakyriakou A, Vourloumis D, Tsatsakis AM, Spandidos DA. 2010. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacol Ther.* 126(1):9-20
- Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM. 2013. Benzo[a]pyrene sensitizes MCF7 breast cancer cells to induction of G1 arrest by the natural flavonoid eupatorin-5-methyl ether, via activation of cell signaling proteins and CYP1-mediated metabolism. *Toxicol Lett.*
- Araujo JR, Goncalves P, Martel F. 2011. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr. Res.* 31(2):77-87
- Babich H, Borenfreund E. 1991. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(7):2101-3
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* 45(2-3):106-14
- Barnes-Ellerbe S, Knudsen KE, Puga A. 2004. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin blocks androgen-dependent cell proliferation of LNCaP cells through modulation of pRB phosphorylation. *Mol. Pharmacol* 66(3):502-11
- Bartova E, Krejci J, Harnicarova A, Galiova G, Kozubek S. 2008. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 56(8):711-21
- Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S et al. 1998. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17(3):313-25
- Beurel E, Jope RS. 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol.* 79(4):173-89
- Binkova B, Giguere Y, Rossner P, Jr., Dostal M, Sram RJ. 2000. The effect of dibenzo[a,1]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21(WAF1) proteins and cell cycle distribution. *Mutat. Res.* 471(1-2):57-70
- Bock KW. 1993. The Aryl hydrocarbon (Ah) or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 125:1-42

- Bock KW, Kohle C. 2005. Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 69(10):1403-8
- Bock KW, Kohle C. 2006. Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem. Pharmacol.* 72(4):393-404
- Bolt HM, Roos PH. Cytochromes P450. [1], 66-72. 2008. Cytochromes P450: Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and other Xenobiotics. Ioannides, Costas. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev* 56(11):317-33
- Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573):1655-7
- Cantley LC, Neel BG. 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96(8):4240-5
- Carlson DB, Perdew GH. 2002. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem Mol. Toxicol* 16(6):317-25
- Carrier F, Owens RA, Nebert DW, Puga A. 1992. Dioxin-dependent activation of murine Cyp1a-1 gene transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 12(4):1856-63
- Chao JI, Su WC, Liu HF. 2007. Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT. *Mol. Cancer Ther.* 6(11):3039-48
- Chaudhary A, Willett KL. 2006. Inhibition of human cytochrome CYP 1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. *Toxicology* 217(2-3):194-205
- Chen S, Nguyen N, Tamura K, Karin M, Tukey RH. 2003. The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278(21):19526-33
- Chen YH, Tukey RH. 1996. Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 271(42):26261-6
- Chien SY, Wu YC, Chung JG, Yang JS, Lu HF et al. 2009. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Hum. Exp. Toxicol* 28(8):493-503
- Cho YC, Zheng W, Jefcoate CR. 2004. Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. *Toxicol Appl. Pharmacol* 199(3):220-38

- Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC. 1999. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J.* 340 (Pt 3):715-22
- Cobb MH, Goldsmith EJ. 2000. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci.* 25(1):7-9
- Cohen LH, Newrock KM, Zweidler A. 1975. Stage-specific switches in histone synthesis during embryogenesis of the sea urchin. *Science* 190(4218):994-7
- Cohen P, Frame S. 2001. The renaissance of GSK3. *Nat. Rev Mol. Cell Biol.* 2(10):769-76
- Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC et al. 2007. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death. Differ.* 14(4):693-702
- Cox MB, Miller CA, III. 2002. The p23 co-chaperone facilitates dioxin receptor signaling in a yeast model system. *Toxicol Lett.* 129(1-2):13-21
- Cox MB, Miller CA, III. 2004. Cooperation of heat shock protein 90 and p23 in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Cell Stress. Chaperones.* 9(1):4-20
- Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. 2006. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev Cancer* 6(3):184-92
- Davis JW, Jr., Burdick AD, Lauer FT, Burchiel SW. 2003. The aryl hydrocarbon receptor antagonist, 3'methoxy-4'nitroflavone, attenuates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent regulation of growth factor signaling and apoptosis in the MCF-10A cell line. *Toxicol Appl. Pharmacol* 188(1):42-9
- Elizondo G, Fernandez-Salguero P, Sheikh MS, Kim GY, Fornace AJ et al. 2000. Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol. Pharmacol* 57(5):1056-63
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339(1):37-59
- Fernandes-Alnemri T, Takahashi A, Armstrong R, Krebs J, Fritz L et al. 1995. Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res.* 55(24):6045-52
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9):959-67
- Flaveny C, Perdew GH, Miller CA, III. 2009. The Aryl-hydrocarbon receptor does not require the p23 co-chaperone for ligand binding and target gene expression in vivo. *Toxicol Lett.* 189(1):57-62
- Flis S, Jastrzebski Z, Namiesnik J, Arancibia-Avila P, Toledo F et al. 2012. Evaluation of inhibition of cancer cell proliferation in vitro with different berries and

- correlation with their antioxidant levels by advanced analytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 62:68-78
- Focus. 2006. *Focus Online*,
- Fragkos M, Jurvansuu J, Beard P. 2009. H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway. *Mol. Cell Biol.* 29(10):2828-40
- Frame S, Cohen P. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J.* 359(Pt 1):1-16
- Franco S, Gostissa M, Zha S, Lombard DB, Murphy MM et al. 2006. H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations. *Mol. Cell* 21(2):201-14
- Friedrich Lottspeich, Haralabos Zorbas. Bioanalytik. 1998. Spektrum Akademischer Verlag; Auflage: 1 (1998). Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Fulwyler MJ. 1965. Electronic separation of biological cells by volume. *Science* 150(3698):910-1
- Gallagher DJ, Smith JD, Offit K, Stadler ZK. 2010. Diagnosing hereditary colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 9(4):205-11
- Garnett MJ, Marais R. 2004. Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell* 6(4):313-9
- Ge NL, Elferink CJ. 1998. A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 273(35):22708-13
- Gierthy JF, Crane D. 1984. Reversible inhibition of in vitro epithelial cell proliferation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl. Pharmacol* 74(1):91-8
- Gilot D, Giudicelli F, Lagadic-Gossmann D, Fardel O. 2010. Akti-1/2, an allosteric inhibitor of Akt 1 and 2, efficiently inhibits CaMKI α activity and aryl hydrocarbon receptor pathway. *Chem. Biol. Interact.* 188(3):546-52
- Gottlicher M, Cikryt P, Wiebel FJ. 1990. Inhibition of growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in 5L rat hepatoma cells is associated with the presence of Ah receptor. *Carcinogenesis* 11(12):2205-10
- Gu Y. 2002. The Pas Superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 40:519-61
- Gurtu V, Kain SR, Zhang G. 1997. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal. Biochem* 251(1):98-102
- Hankinson O. 2005. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem Biophys.* 433(2):379-86
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770-6

- Henklova P, Vrzal R, Ulrichova J, Dvorak Z. 2008. Role of mitogen-activated protein kinases in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chem. Biol. Interact.* 172(2):93-104
- Hodek P, Koblihova J, Kizek R, Frei E, Arlt VM, Stiborova M. 2013. The relationship between DNA adduct formation by benzo[a]pyrene and expression of its activation enzyme cytochrome P450 1A1 in rat. *Environ. Toxicol Pharmacol* 36(3):989-96
- Hoffer A, Chang CY, Puga A. 1996. Dioxin induces transcription of fos and jun genes by Ah receptor-dependent and -independent pathways. *Toxicol Appl. Pharmacol* 141(1):238-47
- Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH et al. 1991. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252(5008):954-8
- Hollingshead BD, Petrulis JR, Perdew GH. 2004. The aryl hydrocarbon (Ah) receptor transcriptional regulator hepatitis B virus X-associated protein 2 antagonizes p23 binding to Ah receptor-Hsp90 complexes and is dispensable for receptor function. *J. Biol. Chem.* 279(44):45652-61
- Hord NG, Perdew GH. 1994. Physicochemical and immunocytochemical analysis of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: characterization of two monoclonal antibodies to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Mol. Pharmacol* 46(4):618-26
- Hruba E, Trilecova L, Marvanova S, Krcmar P, Vykopalova L et al. 2010. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons fail to induce the p53-dependent DNA damage response, apoptosis or cell-cycle arrest in human prostate carcinoma LNCaP cells. *Toxicol. Lett.* 197(3):227-35
- IARC. Iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risk of the chemicals to humans. 1-95. 2006. International Agency for Research on Cancer. Ref Type: Generic
- IARC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. 2010. Ref Type: Generic
- Ikuta T, Eguchi H, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K. 1998. Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 273(5):2895-904
- Ikuta T, Kobayashi Y, Kawajiri K. 2004. Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 279(18):19209-16
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K et al. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 236(2):313-22
- Izawa H, Watanabe G, Taya K, Sagai M. 2007. Inhibitory effects of foods and polyphenols on activation of aryl hydrocarbon receptor induced by diesel exhaust particles. *Environ. Sci.* 14(3):149-56

- Jacks T, Weinberg RA. 1998. The expanding role of cell cycle regulators. *Science* 280(5366):1035-6
- Jaiswal AK. 1991. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry* 30(44):10647-53
- Jiang Y, Chen X, Yang G, Wang Q, Wang J et al. 2013. BaP-induced DNA damage initiated p53-independent necroptosis via the mitochondrial pathway involving Bax and Bcl-2. *Hum. Exp. Toxicol*
- Kann S, Huang MY, Estes C, Reichard JF, Sartor MA et al. 2005. Arsenite-induced aryl hydrocarbon receptor nuclear translocation results in additive induction of phase I genes and synergistic induction of phase II genes. *Mol. Pharmacol* 68(2):336-46
- Karchner SI, Franks DG, Powell WH, Hahn ME. 2002. Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. *J. Biol. Chem.* 277(9):6949-59
- Kazlauskas A, Sundstrom S, Poellinger L, Pongratz I. 2001. The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol. Cell Biol.* 21(7):2594-607
- Kim HJ, Lee SB, Park SK, Kim HM, Park YI, Dong MS. 2005. Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP 1A and CYP1B1 enzymes. *Arch. Pharm. Res.* 28(10):1114-21
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.* 363(2):89-96
- Ko CB, Kim SJ, Park C, Kim BR, Shin CH et al. 2004. Benzo(a)pyrene-induced apoptotic death of mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells via activation of intrinsic caspase cascade and mitochondrial dysfunction. *Toxicology* 199(1):35-46
- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y et al. 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell Biol.* 24(16):7130-9
- Kolluri SK, Weiss C, Koff A, Gottlicher M. 1999. p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev.* 13(13):1742-53
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5
- LaPres JJ, Glover E, Dunham EE, Bunker MK, Bradfield CA. 2000. ARA9 modifies agonist signaling through an increase in cytosolic aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 275(9):6153-9
- Lauren DR, Smith WA, Adaim A, Cooney JM, Wibisono R et al. 2009. Chemical composition and in vitro anti-inflammatory activity of apple phenolic extracts and of their sub-fractions. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 60 Suppl 7:188-205

- Lee BM, Shim GA. 2007. Dietary exposure estimation of benzo[a]pyrene and cancer risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health A* 70(15-16):1391-4
- Lees MJ, Peet DJ, Whitelaw ML. 2003. Defining the role for XAP2 in stabilization of the dioxin receptor. *J. Biol. Chem.* 278(38):35878-88
- Leung HY, Wang Y, Chan HY, Leung LK. 2007. Developing a high-throughput system for the screening of cytochrome P450 1A1--inhibitory polyphenols. *Toxicol In Vitro* 21(6):996-1002
- Levine SL, Perdew GH. 2001. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)/AhR nuclear translocator (ARNT) activity is unaltered by phosphorylation of a periodicity/ARNT/single-minded (PAS)-region serine residue. *Mol. Pharmacol* 59(3):557-66
- Levine-Fridman A, Chen L, Elferink CJ. 2004. Cytochrome P4501A1 promotes G1 phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity. *Mol. Pharmacol* 65(2):461-9
- Lewtas J. 2007. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat. Res.* 636(1-3):95-133
- Li SY, Dougherty JJ. 1997. Inhibitors of serine/threonine-specific protein phosphatases stimulate transcription by the Ah receptor/Arnt dimer by affecting a step subsequent to XRE binding. *Arch. Biochem Biophys.* 340(1):73-82
- Li W, Du B, Wang T, Wang S, Zhang J. 2009. Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via the Ataxia-Telangiectasia Mutated-p53 pathway with the involvement of p53 Upregulated Modulator of Apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 177(2):121-7
- Long WP, Pray-Grant M, Tsai JC, Perdew GH. 1998. Protein kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol. Pharmacol* 53(4):691-700
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648):251-60
- Lundberg AS, Weinberg RA. 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell Biol.* 18(2):753-61
- Luo H, Rankin GO, Li Z, Depriest L, Chen YC. 2011. Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. *Food Chem.* 128(2):513-9
- Ma C, Marlowe JL, Puga A. 2009. The aryl hydrocarbon receptor at the crossroads of multiple signaling pathways. *EXS* 99:231-57

- Ma Q, Whitlock JP, Jr. 1997. A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Biol. Chem.* 272(14):8878-84
- Mahon MJ, Gasiewicz TA. 1995. Ah receptor phosphorylation: localization of phosphorylation sites to the C-terminal half of the protein. *Arch. Biochem Biophys.* 318(1):166-74
- Marlowe JL, Puga A. 2005. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J. Cell Biochem* 96(6):1174-84
- Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ et al. 2001. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat. Genet.* 28(4):355-60
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2003. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* 278(24):21592-600
- Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM. 1999. Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis* 20(10):1885-91
- Mense SM, Chhabra J, Bhat HK. 2008. Preferential induction of cytochrome P450 1A1 over cytochrome P450 1B1 in human breast epithelial cells following exposure to quercetin. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.* 110(1-2):157-62
- Meyer BK, Perdew GH. 1999. Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry* 38(28):8907-17
- Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G. 2005. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 280(21):20340-8
- Michailidi C, Papavassiliou AG, Troungos C. 2012. DNA repair mechanisms in colorectal carcinogenesis. *Curr. Mol. Med.* 12(3):237-46
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52(4):673-751
- Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 13(1):20-5
- Molyneux P. 2004. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, (2)

- Murray GI, Melvin WT, Burke MD. 1995. Cytochrome P450 expression in tumours. *J. Pathol.* 176(3):323-4
- Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF et al. 1997. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* 57(14):3026-31
- Murray GI, Taylor VE, McKay JA, Weaver RJ, Ewen SW et al. 1995. The immunohistochemical localization of drug-metabolizing enzymes in prostate cancer. *J. Pathol.* 177(2):147-52
- Nebert DW, Gonzalez FJ. 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev Biochem* 56:945-93
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 59(1):65-85
- Nebert DW, Shi Z, Galvez-Peralta M, Uno S, Dragin N. 2013. Oral benzo[a]pyrene: understanding pharmacokinetics, detoxication, and consequences--Cyp1 knockout mouse lines as a paradigm. *Mol. Pharmacol* 84(3):304-13
- Niestroy J, Barbara A, Herbst K, Rode S, van LM, Roos PH. 2011. Single and concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the AhR and Nrf2-pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Toxicol. In Vitro* 25(3):671-83
- Nijveldt RJ, van NE, van Hoorn DE, Boelens PG, van NK, van Leeuwen PA. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74(4):418-25
- Nukaya M, Lin BC, Glover E, Moran SM, Kennedy GD, Bradfield CA. 2010. The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) is required for dioxin-induced hepatotoxicity but not for the induction of the Cyp1a1 and Cyp1a2 genes. *J. Biol. Chem.* 285(46):35599-605
- Okawa H, Motohashi H, Kobayashi A, Aburatani H, Kensler TW, Yamamoto M. 2006. Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 339(1):79-88
- Olive PL, Banath JP, Durand RE. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.* 122(1):86-94
- Orchel A, Dzierzewicz Z, Parfiniewicz B, Weglarz L, Wilczok T. 2005. Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent. *Dig. Dis. Sci.* 50(3):490-8
- Park SJ, Yoon WK, Kim HJ, Son HY, Cho SW et al. 2005. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activates ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in RAW 264.7 cells. *Anticancer Res.* 25(4):2831-6

- Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M et al. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev* 22(2):153-83
- Peters U, Jiao S, Schumacher FR, Hutter CM, Aragaki AK et al. 2013. Identification of Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Tumors in a Genome-Wide Meta-analysis. *Gastroenterology* 144(4):799-807
- Petrulis JR, Kusnadi A, Ramadoss P, Hollingshead B, Perdew GH. 2003. The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 278(4):2677-85
- Phillips DH. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.* 443(1-2):139-47
- Phillips DH, Venitt S. 2012. DNA and protein adducts in human tissues resulting from exposure to tobacco smoke. *Int. J. Cancer* 131(12):2733-53
- Pongratz I, Stromstedt PE, Mason GG, Poellinger L. 1991. Inhibition of the specific DNA binding activity of the dioxin receptor by phosphatase treatment. *J. Biol. Chem.* 266(25):16813-7
- Pratt WB. 1997. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol* 37:297-326
- Puga A, Ma C, Marlowe JL. 2009. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 77(4):713-22
- Puga A, Marlowe J, Barnes S, Chang CY, Maier A et al. 2002. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology* 181-182:171-7
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12(2):162-9
- Reiners JJ, Jr., Lee JY, Clift RE, Dudley DT, Myrand SP. 1998. PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol. Pharmacol* 53(3):438-45
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med. Res. Rev* 23(4):519-34
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273(10):5858-68
- Romagnolo DF, Selmin OI. 2012. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *J. Nutr. Gerontol. Geriatr.* 31(3):206-38
- Roos PH. 2002. Differential induction of CYP1A1 in duodenum, liver and kidney of rats after oral intake of soil containing polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Toxicol.* 76(2):75-82

- Rushmore TH, Pickett CB. 1990. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* 265(24):14648-53
- Russo A, Schmid E, Nurbaeva MK, Yang W, Yan J et al. 2013. PKB/SGK-dependent GSK3-phosphorylation in the regulation of LPS-induced Ca(2+) increase in mouse dendritic cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 437(3):336-41
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT et al. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-4
- Salas VM, Burchiel SW. 1998. Apoptosis in Daudi human B cells in response to benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol. *Toxicol Appl. Pharmacol* 151(2):367-76
- Sandermann W. 1984. *Naturwissenschaftliche Rundschau*,
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci. Nutr.* 45(4):287-306
- Schlezinger JJ, Liu D, Farago M, Seldin DC, Belguise K et al. 2006. A role for the aryl hydrocarbon receptor in mammary gland tumorigenesis. *Biol. Chem.* 387(9):1175-87
- Schmidt N. Evolution des programmierten Zelltods: Biochemische und immunhistochemische Untersuchungen an Caspasen in Hydra, LMU München. 2003. 2003. Ref Type: Unenacted Bill/Resolution
- Schmidt JV, Bradfield CA. 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:55-89
- Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. 1996. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93(13):6731-6
- Schwarz D, Kisselev P, Roots I. 2005. CYP1A1 genotype-selective inhibition of benzo[a]pyrene activation by quercetin. *Eur. J. Cancer* 41(1):151-8
- Schwarz D, Roots I. 2003. In vitro assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 303(3):902-7
- Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. 2002. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.* 158(4):486-92
- Segar R, Krebs EG. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9(9):726-35
- Sekhar KR, Yan XX, Freeman ML. 2002. Nrf2 degradation by the ubiquitin proteasome pathway is inhibited by KIAA0132, the human homolog to INrf2. *Oncogene* 21(44):6829-34

- Sendra JM, Sentandreu E, Navarro JL. 2007. Kinetic model for the antiradical activity of the isolated p-catechol group in flavanone type structures using the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl as the antiradical probe. *J. Agric. Food Chem.* 55(14):5512-22
- Shaw M, Cohen P, Alessi DR. 1997. Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS Lett.* 416(3):307-11
- Sherr CJ, Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13(12):1501-12
- Shetty PV, Bhagwat BY, Chan WK. 2003. P23 enhances the formation of the aryl hydrocarbon receptor-DNA complex. *Biochem Pharmacol* 65(6):941-8
- Shi Z, Dragin N, Miller ML, Stringer KF, Johansson E et al. 2010. Oral benzo[a]pyrene-induced cancer: two distinct types in different target organs depend on the mouse Cyp1 genotype. *Int. J. Cancer* 127(10):2334-50
- Shimada T. 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet.* 21(4):257-76
- Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 95(1):1-6
- Shou M, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV. 1996. Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene by human recombinant cytochromes P450, lung and liver microsomes. *Carcinogenesis* 17(11):2429-33
- Siddens LK, Larkin A, Krueger SK, Bradfield CA, Waters KM et al. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: comparison of benzo[a]pyrene, dibenzo[def,p]chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264(3):377-86
- Siess MH, Le Bon AM, Suschetet M, Rat P. 1990. Inhibition of ethoxyresorufin deethylase activity by natural flavonoids in human and rat liver microsomes. *Food Addit. Contam* 7 Suppl 1:S178-S181
- Siess MH, Leclerc J, Canivenc-Lavier MC, Rat P, Suschetet M. 1995. Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicol Appl. Pharmacol* 130(1):73-8
- Silva ID, Rodrigues AS, Gaspar J, Maia R, Laires A, Rueff J. 1997. Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis* 12(5):383-90
- Singh MP, Mishra M, Sharma A, Shukla AK, Mudiam MK et al. 2011. Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicol Appl. Pharmacol* 253(1):14-30

- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175(1):184-91
- Solhaug A, Refsnes M, Holme JA. 2004. Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo[a]pyrene and cyclopenta[c,d]pyrene in Hepa1c1c7 cells. *J. Cell Biochem* 93(6):1143-54
- Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB et al. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277(5325):567-70
- Summers WC. 1970. A simple method for extraction of RNA from E. coli utilizing diethyl pyrocarbonate. *Anal. Biochem.* 33(2):459-63
- Sun B, Ross SM, Trask OJ, Carmichael PL, Dent M et al. 2013. Assessing dose-dependent differences in DNA-damage, p53 response and genotoxicity for quercetin and curcumin. *Toxicol In Vitro* 27(6):1877-87
- Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA. 1995. DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J. Biol. Chem.* 270(44):26292-302
- Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. 2011. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 16(2):123-40
- Takemura H, Nagayoshi H, Matsuda T, Sakakibara H, Morita M et al. 2010. Inhibitory effects of chrysoeriol on DNA adduct formation with benzo[a]pyrene in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology* 274(1-3):42-8
- Tan Z, Chang X, Puga A, Xia Y. 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem Pharmacol* 64(5-6):771-80
- Tan Z, Huang M, Puga A, Xia Y. 2004. A critical role for MAP kinases in the control of Ah receptor complex activity. *Toxicol Sci.* 82(1):80-7
- Tekpli X, Rissel M, Huc L, Catheline D, Sergent O et al. 2010. Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol Appl. Pharmacol* 243(1):68-76
- Terao J. 2009. Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum Nutr.* 61:87-94
- Theodoratou E, Kyle J, Cetnarskyj R, Farrington SM, Tenesa A et al. 2007. Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16(4):684-93
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76(9):4350-4

- Vanhaesebroeck B, Alessi DR. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* 346 Pt 3:561-76
- Verma N, Pink M, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. 2012. Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics.* 12(11):1731-55
- Verma N, Pink M, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. 2013. Benzo[a]pyrene-mediated toxicity in primary pig bladder epithelial cells: A proteomic approach. *J. Proteomics.* 85C:53-64
- Vivanco I, Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev Cancer* 2(7):489-501
- Vondracek J, Krcmar P, Prochazkova J, Trilecova L, Gavelova M et al. 2009. The role of aryl hydrocarbon receptor in regulation of enzymes involved in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a model of rat liver progenitor cells. *Chem. Biol. Interact.* 180(2):226-37
- Vrba J, Kren V, Vacek J, Papouskova B, Ulrichova J. 2012. Quercetin, quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and CYP1A1 expression in HepG2 cells. *Phytother. Res.* 26(11):1746-52
- Wang L, He X, Szklarz GD, Bi Y, Rojanasakul Y, Ma Q. 2013. The aryl hydrocarbon receptor interacts with nuclear factor erythroid 2-related factor 2 to mediate induction of NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Biochem Biophys.* 537(1):31-8
- Watzl B, Rechkemmer G. 2001. *Ernährungsumschau*,
- Weiss C, Faust D, Durk H, Kolluri SK, Pelzer A et al. 2005. TCDD induces c-jun expression via a novel Ah (dioxin) receptor-mediated p38-MAPK-dependent pathway. *Oncogene* 24(31):4975-83
- Wen X, Walle T. 2005. Preferential induction of CYP1B1 by benzo[a]pyrene in human oral epithelial cells: impact on DNA adduct formation and prevention by polyphenols. *Carcinogenesis* 26(10):1774-81
- West MH, Bonner WM. 1980. Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* 19(14):3238-45
- Weston CR, Davis RJ. 2007. The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19(2):142-9
- Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M et al. 1988. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334(6178):124-9
- Wieder T, Essmann F, Prokop A, Schmelz K, Schulze-Osthoff K et al. 2001. Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 97(5):1378-87

- Wu R, Zhang L, Hoagland MS, Swanson HI. 2007. Lack of the aryl hydrocarbon receptor leads to impaired activation of AKT/protein kinase B and enhanced sensitivity to apoptosis induced via the intrinsic pathway. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 320(1):448-57
- Wu RS, Panusz HT, Hatch CL, Bonner WM. 1986. Histones and their modifications. *CRC Crit Rev Biochem* 20(2):201-63
- Xue W, Warshawsky D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206(1):73-93
- Yan C, Lu J, Zhang G, Gan T, Zeng Q et al. 2011. Benzo[a]pyrene induces complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM, ATR, and DNA-PK. *Toxicol. In Vitro* 25(1):91-9
- Yates MS, Tran QT, Dolan PM, Osburn WO, Shin S et al. 2009. Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis* 30(6):1024-31
- Ye R, Goodarzi AA, Kurz EU, Saito S, Higashimoto Y et al. 2004. The isoflavonoids genistein and quercetin activate different stress signaling pathways as shown by analysis of site-specific phosphorylation of ATM, p53 and histone H2AX. *DNA Repair (Amst)* 3(3):235-44
- Yeager RL, Reisman SA, Aleksunes LM, Klaassen CD. 2009. Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery". *Toxicol Sci.* 111(2):238-46
- Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE. 1998. Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metab Dispos.* 26(10):989-92
- Zhang S, Qin C, Safe SH. 2003. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ. Health Perspect.* 111(16):1877-82
- Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P. 2004. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol. Cancer Ther.* 3(2):187-97
- Zhao J, Wang LP, Nie JS, Niu Q. 2011. [Effects of benzo(a)pyrene on apoptosis of neuronal cells and expression of Bcl-2 and Bax proteins in rat brain tissue]. *Zhonghua Lao. Dong. Wei Sheng Zhi. Ye. Bing. Za Zhi.* 29(11):820-4
- Zhou C, Li Z, Diao H, Yu Y, Zhu W et al. 2006. DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat. Res.* 604(1-2):8-18

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Struktur von Benzo[a]pyren (BaP) mit markierter Bay-Region	- 9 -
Abbildung 2: Graphische Darstellung des BaP-Metabolismus.	- 9 -
Abbildung 3: Gruppierung der Flavonoide und ihre chemische Struktur R1, R2, R3 = H oder OH.	- 14 -
Abbildung 4: Struktur der verwendeten Flavonoide aus der Gruppe der Flavonole.	- 15 -
Abbildung 5: Prinzip des BC-Assays zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Friedrich Lottspeich & Haralabos Zorbas 1998)	- 32 -
Abbildung 6: Funktionsprinzip der TaqMan® Sonden	- 39 -
Abbildung 7: Darstellung einer 24 h mit BaP-inkubierten Zelle nach der Durchführung des Comet-Assays.	- 40 -
Abbildung 8: Graphische Darstellung einer FACS Analyse	- 42 -
Abbildung 9: Prinzip der Ethoxyresorufin-O-deethylase katalysierten Reaktion.	- 43 -
Abbildung 10: Schematische Darstellung der direkten und indirekten Immunfluoreszenz	- 45 -
Abbildung 11: Nachweis der prozentualen Caco-2-Zellviabilität bei verschiedenen Flavonoid- und BaP-Konzentrationen mittels Zytotoxtests	- 49 -
Abbildung 12: Nachweis von Effekten der Flavonoid- und BaP-induzierten DNA-Schäden in Caco-2-Zellen mittels COMET-Assay.	- 50 -
Abbildung 13: Quantifizierung der im Comet-Assay nachgewiesenen DNA-Strangbrüche in Caco-2-Zellen durch BaP oder Flavonoide.	- 51 -
Abbildung 14: Nachweis der Induktion des Proteins γ H2Ax mittels Immunfluoreszenz.	- 52 -
Abbildung 15: Nachweis der Induktion des γ H2Ax durch BaP oder Flavonoide in Caco-2-Zellen.	- 53 -
Abbildung 16: FACS-Analyse zur Ermittlung der Induktion der Apoptose durch BaP oder Flavonoide in Caco-2-Zellen.	- 54 -
Abbildung 17: Auswirkung von BaP und Flavonoiden auf den relativen mRNA-Spiegel von Apoptosemarkern in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).	- 55 -
Abbildung 18: Nachweis von BaP- und Flavonoid-Effekten auf die Proteinspiegel der Apoptosemarker Bax und Bcl-2 in Caco-2-Zellen	- 56 -
Abbildung 19: Beeinflussung der Caspase-3-Aktivität durch BaP oder Flavonoide in Caco-2-Zellen.	- 57 -
Abbildung 20: Bestimmung des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf den Zellzyklus in Caco-2-Zellen durch FACS-Analyse.	- 58 -
Abbildung 21: Einfluss von BaP und Flavonoiden auf den mRNA-Spiegel Zellzyklus-relevanter Komponenten in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).	- 58 -
Abbildung 22: Nachweis der Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen über Immunfluoreszenz.	- 59 -
Abbildung 23: BaP- und Flavonoideffekte auf die Phosphorylierung des pRb-Proteins in Caco-2-Zellen	- 59 -
Abbildung 24: Nachweis der Veränderungen des mRNA-Levels der Komponenten des AhR-Signalweges in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).	- 60 -
Abbildung 25: BaP- und Flavonoideffekte auf die Induktion des AhR-Proteins in Caco-2-Zellen.	- 61 -
Abbildung 26: BaP- und Flavonoideffekte auf die Induktion des AhRR-Proteins in Caco-2-Zellen.	- 62 -
	- 193 -

Abbildung 27: BaP- und Flavonoideffekte auf die Induktion des CYP1A1-Proteins in Caco-2-Zellen.	- 62 -
Abbildung 28: Ermittlung der konzentrationsabhängigen Beeinflussung der CYP1A1-Aktivität durch BaP und Flavonoide in Caco-2-Zellen.	- 64 -
Abbildung 29: Nachweis der Veränderungen des mRNA-Spiegels der MAPK in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 65 -
Abbildung 30: Nachweis des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf die Proteinexpression der MAPK JNK und dessen Phosphorylierung in Caco-2-Zellen (Western-Blot)	- 66 -
Abbildung 31: Nachweis des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf die Proteinexpression der MAPK p38 und dessen Phosphorylierung in Caco-2-Zellen (Western-Blot)	- 67 -
Abbildung 32: Nachweis des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf die Proteinexpression der MAPK ERK und dessen Phosphorylierung in Caco-2-Zellen (Western-Blot)	- 68 -
Abbildung 33: Nachweis der Veränderungen des mRNA-Spiegels von AKT-Signalwegskomponenten (AKT) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 69 -
Abbildung 34: Nachweis des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf die Proteinexpression der AKT-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen (Western-Blot).	- 70 -
Abbildung 35: Einfluss von BaP und Flavonoiden auf die mRNA-Spiegel von Komponenten des Nrf2-Signalweges in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).	- 71 -
Abbildung 36: Nachweis des Einflusses von BaP und Flavonoiden auf die Proteinexpression der Nrf2-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen	- 72 -
Abbildung 37: Effekte von BaP-Flavonoid-Kombinationen auf DNA-Schäden in Caco-2-Zellen (Comet-Assay).	- 73 -
Abbildung 38: Quantifizierung der im Comet-Assay nachgewiesenen DNA-Strangbrüche über das Olive tail moment.	- 74 -
Abbildung 39: Nachweis der γ H2Ax-Induktion in Caco-2-Zellen mittels Immunfluoreszenz.	- 75 -
Abbildung 40: Nachweis von Flavonoideffekten auf die BaP-induzierte Erhöhung des γ H2Ax-Spiegels in Caco-2-Zellen.	- 76 -
Abbildung 41: FACS-Analyse. Einfluss von Flavonoiden auf die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen.	- 77 -
Abbildung 42: Einfluss von BaP-Flavonoid-Kombinations-Effekten des mRNA-Spiegels von Apoptosemarkern (Nf κ B, p73, Bax und Bcl-2) in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).	- 78 -
Abbildung 43: Nachweis von Flavonoideffekten auf BaP-medierte Induktionen auf Apoptosemarker in Caco-2-Zellen.	- 79 -
Abbildung 44: Einfluss von Flavonoiden auf BaP-medierte Effekte der Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen.	- 80 -
Abbildung 45: Einfluss von BaP-Flavonoidenkombinationen auf Zellzykluseffekte (FACS-Analyse).	- 81 -
Abbildung 46: Einfluss von Flavonoiden auf BaP-medierte Veränderungen des mRNA Spiegels von Zellzyklus-relevanten Komponenten (p21, p27, c-jun) in Caco-2-Zellen	- 82 -
Abbildung 47: Ermittlung der Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen über Immunfluoreszenz.	- 83 -
Abbildung 48: Nachweis von Flavonoideffekte auf die BaP vermittelte Phosphorylierung von pRb in Caco-2-Zellen.	- 84 -

Abbildung 49: Einfluss von BaP-Flavonoidkombinationen auf den mRNA-Spiegel der AhR Signalweg-Komponenten AhR, AhRR, ARNT und AIP sowie den Zielgenen CYP1A1 und CYP1B1 in Caco-2-Zellen.	- 85 -
Abbildung 50: Effekt von BaP-Flavonoid-Kombinationen auf die Proteininduktion der AhR-Signalwegskomponente AhRR und des AhR Zielgens CYP1A1 in Caco-2-Zellen.	- 86 -
Abbildung 51: Effekte von Flavonoiden auf die Induktion der CYP1A1-abhängigen EROD-Aktivität durch BaP in Caco-2-Zellen.	- 87 -
Abbildung 52: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf den mRNA-Spiegel der MAPK in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 89 -
Abbildung 53: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die JNK und deren Phosphorylierung in Caco-2-Zellen.	- 90 -
Abbildung 54: Effekte von Flavonoid-BaP-Kombinations auf p38 und deren Phosphorylierung in Caco-2-Zellen.	- 91 -
Abbildung 55: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf ERK und deren Phosphorylierung in Caco-2-Zellen.	- 92 -
Abbildung 56: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf den mRNA-Spiegel der AKT-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 93 -
Abbildung 57: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die AKT-Proteininduktion und deren Phosphorylierung in Caco-2-Zellen.	- 94 -
Abbildung 58: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die PI3K-Proteininduktion in Caco-2-Zellen.	- 94 -
Abbildung 59: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die GSK-3-Proteininduktion in Caco-2-Zellen.	- 95 -
Abbildung 60: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf den mRNA-Spiegel der Nrf2-Signalwegskomponenten in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 96 -
Abbildung 61: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die Nrf2-Proteininduktion in Caco-2-Zellen.	- 97 -
Abbildung 62: Nachweis von Flavonoid-BaP-Kombinations-Effekten auf die GSTP1-Proteininduktion in Caco-2-Zellen.	- 97 -
Abbildung 63: Nachweis der AhR-Abhängigkeit der BaP-induzierten DNA-Schäden über die H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen mittels Immunfluoreszenz.	- 99 -
Abbildung 64: AhR-Abhängigkeit der BaP-vermittelten H2Ax-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen	- 100 -
Abbildung 65: AhR-Abhängigkeit der BaP- und Flavonoideffekte auf die Apoptose in Caco-2-Zellen (FACS-Analyse).	- 102 -
Abbildung 66: AhR-Abhängigkeit der Flavonoideffekte auf die BaP-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen (FACS-Analyse).	- 103 -
Abbildung 67: Nachweis der AhR-Abhängigkeit der BaP-medierten Induktionen von Bax in Caco-2-Zellen.	- 104 -
Abbildung 68: AhR-Abhängigkeit der BaP- und Flavonoid-vermittelten Effekte auf die BaP-induzierte Steigerung der Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen.	- 105 -
Abbildung 69: AhR-Abhängigkeit der Einzeleffekte von BaP und Flavonoiden auf den Zellzyklus in Caco-2-Zellen.	- 106 -
Abbildung 70: AhR-Abhängigkeit der Kombinationseffekte von BaP und Flavonoiden auf den Zellzyklus in Caco-2-Zellen.	- 107 -

Abbildung 71: Nachweis der AhR-Abhängigkeit der BaP-induzierten Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins in Caco-2-Zellen über Immunfluoreszenz.	- 109 -
Abbildung 72: AhR Abhängigkeit der BaP- und Flavonoideffekte auf die Rb-Protein-Phosphorylierung in Caco-2-Zellen	- 110 -
Abbildung 73: AhR-Abhängigkeit der Veränderungen des mRNA-Spiegels von AhR Komponenten (AhR, AhRR) und des AhR-Zielgens (CYP1A1) durch BaP und Flavonoide in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).	- 112 -
Abbildung 74: AhR-Abhängigkeit von Flavonoideffekten auf BaP-medierte Veränderungen des mRNA-Spiegels von AhR-Komponenten (AhR, AhRR und CYP1A1) in Caco-2-Zellen (Real-Time-PCR).	- 113 -
Abbildung 75: Nachweis der AhR-Abhängigkeit von BaP, Flavonoiden und Flavonoideffekten, der CYP1A1 Proteininduktion in Caco-2-Zellen	- 114 -
Abbildung 76: AhR-Abhängigkeit der Effekte von BaP und Flavonoiden (Quercetin) auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen.	- 116 -
Abbildung 77: Nachweis der AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekten auf den mRNA-Spiegel der MAP-Kinasen JNK, p38 und ERK in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 117 -
Abbildung 78: Nachweis von Flavonoideffekten auf BaP-induzierte Veränderungen des mRNA-Spiegels der MAPK (JNK, p38 und ERK) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 118 -
Abbildung 79: AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-medierten Effekten auf die JNK und deren Phosphorylierung in Caco-2-Zellen	- 120 -
Abbildung 80: AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-medierten Effekten auf die MAPK p38 und dessen Phosphorylierung in Caco-2-Zellen	- 121 -
Abbildung 81: AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekten auf den mRNA-Spiegel der AKT-Signalwegkomponenten (AKT, PTEN und PI3K) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 122 -
Abbildung 82: AhR-Abhängigkeit BaP- und Flavonoid-Effekte auf den mRNA-Spiegel der AKT-Signalwegkomponenten (AKT, PTEN und PI3K) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 123 -
Abbildung 83: AhR-Abhängigkeit von BaP- und Flavonoid-Effekten auf den mRNA-Spiegel der Nrf2-Signalwegkomponenten (Nrf2 und keap1) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 125 -
Abbildung 84: AhR-Abhängigkeit BaP- und Flavonoid-Effekte auf den mRNA-Spiegel der Nrf2-Signalwegkomponenten (Nrf2 und keap1) in Caco-2-Zellen mittels Real-Time-PCR.	- 125 -
Abbildung 85: β -Naphthoflavin als CYP1A1 Induktor im Vergleich zu BaP in Caco-2-Zellen	- 127 -
Abbildung 86: Einfluss von β -Naphthoflavin auf die CYP1A1-Aktivität in Caco-2-Zellen im Vergleich zu BaP (EROD).	- 129 -
Abbildung 87: Nachweis der Induktion des γ H2Ax-Protein-Spiegels durch BaP oder β -Naphthoflavin in Caco-2-Zellen mittels Immunfluoreszenz.	- 131 -
Abbildung 88: Nachweis der Induktion der γ H2Ax-Expression durch BaP oder β -Naphthoflavin in Caco-2-Zellen nach Hemmung der Ausbildung reaktiver Metabolite mittels Immunfluoreszenz.	- 134 -
Abbildung 89: Einfluss von BaP oder β -NF auf den γ H2Ax-Protein-Level in Caco-2-Zellen in Gegenwart des CYP1A1-Inhibitors α -NF.	- 135 -
Abbildung 90: Nachweis der Induktion der Apoptose in Caco-2-Zellen durch β -NF mittels FACS-Analyse.	- 137 -

Abbildung 91: Ermittlung von Flavonoidwirkungen auf die β -Naphthoflavon-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen im Vergleich zur Wirkung auf BaP-Effekte mittels FACS-Analyse.	- 138 -
Abbildung 92: Effekte des AhR-Inhibitors MNF und des CYP1A1-Inhibitors α -NF auf die durch BaP, β -NF und Quercetin modulierte Apoptose in Caco-2-Zellen.	- 139 -
Abbildung 93: Effekte von BaP und β -NF auf die Spiegel der Apoptose-relevanten Proteine Bax und Bcl-2 unter dem Einfluss des CYP1A1-Inhibitors α -NF sowie der Flavonoide Quercetin und Galangin	- 141 -
Abbildung 94: Effekte von BaP, β -NF und α -NF auf die Induktion der Caspase-3-Aktivität in Caco-2-Zellen.	- 142 -
Abbildung 95: Nachweis des Phospho-Rb-Proteins in BaP- und β -NF-behandelten Caco-2-Zellen mittels Immunfluoreszenz.	- 143 -
Abbildung 96: Effekt von BaP und β -NF auf die pRb-Phosphorylierung in Gegenwart eines AhR- oder CYP1A1-Inhibitors.	- 145 -
Abbildung 97: Effekte von BaP, β -NF, α -NF und Effekte durch die Inhibierung von CYP1A1 durch α -NF auf die Phosphorylierung des Rb-Proteins in Caco-2-Zellen.	- 145 -
Abbildung 98: Hemmung der CYP1A1-abhängigen EROD-Aktivität durch Flavonoide in BaP-behandelten Caco-2-Zellen.	- 147 -
Abbildung 99: Hemmung der BaP-induzierten CYP1A1 Aktivität in Caco-2-Zellen (EROD).	- 148 -
Abbildung 100: Kinetiken der Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität von Lebermikrosomen in Gegenwart von Galangin in verschiedenen Konzentrationen.	- 149 -
Abbildung 101: Hemmung der lebermikrosomalen Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität durch Galangin.	- 150 -
Abbildung 102: Hemmung der lebermikrosomalen Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität durch Quercetin, Kaempferol und Myricetin.	- 151 -
Abbildung 103: Hemmung der lebermikrosomalen Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität durch Chrysin, Aromadedin und 3-O-Methylquercetin.	- 152 -
Abbildung 104: Struktur von DPPH (links) und vom Radikalfänger Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)	- 153 -
Abbildung 105: DPPH-Spektren	- 154 -
Abbildung 106: Kinetiken der DPPH-Reduktion durch verschiedene Flavonoide:	- 155 -
Abbildung 107: Kinetiken der DPPH-Reduktion durch verschiedene Flavonoide:	- 156 -

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Chemikalienliste	- 25 -
Tabelle 2: Zellkultur-Lösungen	- 26 -
Tabelle 3: Verwendete Antikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz	- 26 -
Tabelle 4: Verwendete Sonden für Real Time PCR	- 27 -
Tabelle 5: IC ₅₀ -Werte für die Hemmung der mikrosomalen EROD-Aktivität durch Flavonoide. Die IC ₅₀ -Werte wurden durch nicht-lineare Regression aus den Hemmkurven berechnet.	- 152 -

11 ANHANG

11.1 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Zusammenwirken des Prokarzinogens Benzo[a]pyren mit pflanzlichen Flavonoiden auf Karzinogenese-relevante Prozesse in der humanen Kolon-Adenokarzinoma-zelllinie Caco-2“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Manuela van Liempt befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____
Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Unterschrift des Doktoranden

11.2 Danksagung

Ich möchte mich zu allererst bei meinem Chef Priv. Doz. Dr. Peter Roos bedanken. Peter du warst/bist der beste Doktorvater, den ich mir hätte wünschen können. Es gab keine dumme Frage dieser Welt, die dich aus der Ruhe gebracht hätte und ich dir nicht hätte stellen dürfen. Egal welche Katastrophen im Labor passiert sind, nichts hat dich aus der Ruhe gebracht. Du hast mich immer wieder motiviert und es tatsächlich zu einem runden Projekt werden lassen. Auch für private Probleme hattest du immer ein offenes Ohr und Verständnis. Für all das und noch viel viel viel mehr, möchte ich mich bei dir bedanken. Es war mir ein Fest meine Promotion unter deiner Leitung durchzuführen. Ohne dich hätte ich es niemals geschafft! DANKE DANKE DANKE!!!!

Als nächstes möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Shirley Knauer bedanken. Du hast mich ohne zu zögern noch in deine Doktoranden-Gruppe aufgenommen und hast es mir ermöglicht, trotz widriger Umstände meiner Promotion ein „Zuhause“ zu geben. Und obwohl du noch genügend andere Doktoranden zu betreuen hattest, hattest auch du immer ein offenes Ohr für Probleme und die Durchführung neuer Methoden in deinem Labor. Danke für alles!!!!

Als nächstes möchte ich mich auch bei meinen Mädels Anke, Claudia und Ingrid bedanken. Unsere Frühstücksrunde fehlt mir jetzt schon. Danke für die tolle gemeinsame Zeit, auch ihr standet mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Es war schön mit euch über all die Pannen und Katastrophen wieder lachen zu können.

Und ich danke natürlich auch meiner „Zimmergenossin“ Inge, die klaglos all meine Zickereien in stressigen Zeiten überstanden hat und mir trotzdem immer alles verziehen hat. Es war/ist schön jemanden neben sich sitzen zu haben, mit dem man über alles reden kann und der sich auch mal von mir ablenken ließ, wenn man gerade seine Arbeit nicht mehr sehen konnte :-D. Danke Inge für alles.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Mann bedanken. Ich bin stolz darauf eine Familie wie euch zu haben, die einen immer unterstützt sei es finanziell oder emotional. Meine Launen nach diversen Katastrophen wurden von euch immer akzeptiert und ihr habt mir immer zugehört, auch wenn ihr manchmal keine Ahnung hattet, worüber ich gerade rede:-D. Um mir genügend Zeit zu ermöglichen, habt ihr immer auch unseren kleinen ADHS Hund Amy bespaßt, auch dafür möchte ich mich bedanken. Bei meinem Mann möchte ich mich dafür bedanken, dass er immer an mich geglaubt hat um mich immer unterstützt hat.

11.3 Lebenslauf

Curriculum vitae



Manuela van Liempt
Geboren am 24.07.1983 in Bottrop

Adresse:
Im Mallingforst 5
46242 Bottrop
0177/2927325

Ausbildung:

März 2007-März 2010

Master of Science in Molekular Biologie (2.1)
Fachhochschule Recklinghausen

Oktober 2003-August 2006

Bachelor of Science in Molekular Biologie (2.5)
Fachhochschule Recklinghausen

Juni 2003

Abschluss: Abitur (2.2)
Josef-Albers-Gymnasium

Erfahrungen:

September 2010-

Promotion im Bereich Molekulare Toxikologie
Leipniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU
Dortmund

März 2009-August 2010

Mitarbeiterin in der Entwicklungsabteilung
Dr. Fooke Laboratorien GmbH Neuss, Germany
Entwicklung von immunologischen Testsystemen

März 2008-März 2010

Research/Master Thesis
Dr. Fooke Laboratorien GmbH Neuss, Germany
*Development of a lateral flow assay (LFA) for the
detection of dsDNA autoantibodies specific for SLE
diagnosis and disease monitoring*

März-Juni 2006

Praxisphase/Bachelor thesis
Bavarian Nordic GmbH München
*Trouble-shooting for phenomenon: loss of red
fluorescence in recombinant MVAs
Evaluation of new red fluorescence proteins*

Juli- August 2004

Praktikum
E-on Ruhrgas Dorsten,
(Wasserer-, Glycol and Kondensat Analytik,
Quantitative Produktion von Kalibrierstandards zur
gaschromatischen Untersuchung von Glycol- und
Wasserstoffanalytik, Coulometrische Untersuchung
von Wasserproben)

Juni- August 2003

Praktikum
E-on Ruhrgas Dorsten
(Physikalische-chemische Untersuchung von
Materialeigenschaften (Dichte, pH, Refraktionsindex,
Brennpunkt), Vorbereitung und Nachbereitung von
physikalischen-chemischen und gaschromatischen
Untersuchungen (Wasser-, Glycol-, und
Kondensatanalytik)

Methoden:

Zellbiologie

Herstellung primärer CEF Zellen

Splitten und Auslegen von primären CEF Zellen

Passagieren von humanen colon carcinoma Zellen (caco-2)

Molekular Biologie

RNA Isolation, Aufreinigung

Protein Isolation, Aufreinigung

Reverse Transkriptase-PCR

Real Time PCR

ELISA (Sandwich)

Lateral flow assay

Nested PCR

Screening PCRs

DNA Isolation, Aufreinigung

Western blot

Cloning (Ligation, restriction)

Gelelektrophorese, SDS-Page

Titration (Plaque Detektion durch Färben)

Virologie

Homologe Rekombination Transfektion

von primären Zellen Generierung eines

rekombinanten Virus (Passagieren,

Plaque Aufreinigung)

Bakteriologie

Isolation von Plasmid DNA aus Bakterien

Computer Anwendungen

MS Office (Word, Excel, Power Point), Vector

NTI, Contig Express, Internet, PubMed, Refman

Sprachen:

Deutsch

Englisch